

# **Neue *N*-substituierte 3-Chlorkenpaullone als Wirkstoffe gegen Trypanosomen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Oliver Christian Friedrich Orban  
aus Northeim

1. Referent: Professor Dr. Conrad Kunick

2. Referent: Professor Dr. Ingo Ott

eingereicht am: 12.07.2017

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.10.2017

Druckjahr 2018

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Publikationen

Orban, O. C. F.; Korn, R. S.; Unger, L.; Yildiz, A.; Kunick, C.: 3-Chlorokenpauillone. Molbank **2015**, M856.

Orban, O. C. F.; Korn, R. S.; Benítez, D.; Medeiros, A.; Preu, L.; Loaec, N.; Meijer, L.; Koch, O.; Comini, M. A.; Kunick, C.: 5-Substituted 3-chlorokenpauillone derivatives are potent inhibitors of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. Bioorg. Med. Chem. **2016**, 24, 3790–3800.

## Tagungsbeiträge

Orban, O. C. F.; Medeiros, A.; Benítez, D.; Comini, M. A.; Kunick, C.:  $N^{\delta}$ -Substituted paullones as inhibitors of *tri-tryp* trypanothione synthetase. (Poster)  
Modern approaches in drug discovery for neglected infectious diseases, international workshop, Montevideo, Uruguay, 03.11–08.11.2014.

Comini, M.; Benítez, D.; Ferreira, V. C.; de Oliveira, C. I.; Kunick, C.; Medeiros, A.; No, J.; Orban, O.; Yang, G.: Target-based drug discovery of compounds interfering with trypanothione biosynthesis in trypanosomatids. (Poster)  
From basic science to biomarkers & tools in global health, Institut Pasteur international network, scientific symposium, Paris, Frankreich, 29.11–02.12.2016.



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2014 bis Juni 2017 am  
Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität  
Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter Anleitung von

**Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,**

dem ich an dieser Stelle für die Überlassung des sehr interessanten Themas, seine  
exzellente Betreuung, die schöne Zeit in seinem Arbeitskreis, sowie seine moralische  
Unterstützung besonders herzlich danke möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Professor Dr. Ingo Ott

für die Übernahme des Koreferates.



*Meiner Mutter Christina und meinem Vater Siegfried gewidmet.*





## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung .....	1
1.1 Die Familie <i>Trypanosomatidae</i> .....	2
1.2 Amerikanische Trypanosomiasis .....	3
1.3 Afrikanische Trypanosomiasis .....	7
1.4 Leishmaniose .....	12
1.5 Das Trypanothion .....	18
1.6 Die Trypanothionsynthetase .....	21
1.6.1 Die Trypanothionsynthetase als Zielenzym .....	23
1.6.2 Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase .....	25
2. Zielsetzung.....	27
3. Untersuchungen zu Protein-Liganden-Wechselwirkungen.....	30
3.1 <i>docking</i> -Untersuchung substituierter Paullone.....	31
3.1.1 Bindungsmodus der substituierten Paullone abgeleitet von der Kristallstruktur der GSK-3 im Komplex mit Alsterpaullon.....	33
3.1.2 Bindungsmodus der substituierten Paullone abgeleitet vom Spermidin-kompetitiven Verhalten $N^6$ -substituierter Paullone .....	47
3.2 Fazit der <i>docking</i> -Studien.....	51
4. Synthese .....	52
4.1 Synthese des 3-Chlorkenpaullons .....	52
4.2 Selektive Substitution am $N^6$ des 3-Chlorkenpaullons.....	54
4.2.1 Synthese von 9-Brom-3-chlor-5-(2-hydroxyethyl)-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepin-6(5 <i>H</i> )-on ( <b>36e</b> ).....	56
4.2.2 Versuche zur Synthese von 5-(2-Aminoethyl)-9-brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepin-6(5 <i>H</i> )-on ( <b>36f</b> ) .....	56
4.3 Selektive Substitution am $N^{12}$ des 3-Chlorkenpaullons .....	58
4.4 Paullon- $N^6$ -acetamide.....	59

4.4.1	Präparative Darstellung von Aminen zur Synthese .....	59
4.4.2	Präparative Darstellung von Paullon- <i>N</i> <sup>5</sup> -acetamiden .....	60
4.5	Versuche zur Reduktion von Paullonen mit Lithiumaluminiumhydrid .....	63
4.6	NMR-spektrometrische Besonderheiten <i>N</i> -substituierter Paullone .....	65
5.	Biochemische und biologische Evaluierung .....	73
5.1	Proliferationsuntersuchungen und Durchflusszytometrie .....	73
5.2	Zytotoxizitätsuntersuchungen .....	75
5.3	Reinigung rekombinanter TryS und TryS-Aktivitätsassay .....	76
5.4	Ergebnisse der biochemischen und biologischen Evaluierung und Diskussion.....	80
6.	Physikochemische Eigenschaften .....	90
6.1	Ergebnisse der Untersuchung von physikochemischen Eigenschaften und Diskussion .....	92
7.	Synthese von Reagenzien für Affinitätsuntersuchungen.....	95
8.	Zusammenfassung.....	103
9.	Summary.....	106
10.	Experimenteller Teil .....	108
10.1	Protein-Liganden- <i>docking</i> .....	108
10.2	Geräte, Methoden und eingesetzte Chemikalien .....	109
10.3	Synthesen .....	113
10.4	Biologische und biochemische Untersuchungen .....	172
10.5	Physikochemische Eigenschaften .....	191
11.	Literatur .....	195
12.	Abbildungsverzeichnis .....	205
13.	Verzeichnis der Schemata .....	208
14.	Tabellenverzeichnis .....	209
	Danksagung .....	211
	Lebenslauf.....	213

## Abkürzungsverzeichnis

ACN: Acetonitril; ADP: Adenosindiphosphat; ARG: Arginase; ATP: Adenosintriphosphat; AUC: *area under the curve*; BCA: Bicinchoninsäure; Boc: *tert*-Butyloxycarbonyl; BOP: Benzotriazol-1-yloxytri(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat; c: Konzentration; CDK: Cyclin-abhängige Kinase; *Cf*: *Crithidia fasciculata*; CHN: Elementaranalyse; COST: *European cooperation in science and technology*; COSY: *correlation spectroscopy*; DAD: Diodenarray-Detektor; DC: Dünnschichtchromatographie; DHA: Dehydroascorbinsäure; DIPEA: *N,N*-Diisopropylethylamin; DMAP: 4-Dimethylaminopyridin; DMF: *N,N*-Dimethylformamid; DMSO: Dimethylsulfoxid; DMSO-*d*<sub>6</sub>: deuteriertes Dimethylsulfoxid; DNA: Desoxyribonukleinsäure; DNDi: *drugs for neglected diseases initiative*; DTT: Dithiothreitol; EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; EI: Elektronenstoßionisation; ESI: Elektronenspray-Ionisation; FSC, FS: Vorwärtsstreulicht; GA: *genetic algorithm*; GFP: Grünes Fluoreszenzprotein; GOLD: *genetic optimisation for ligand docking*; Gpx: Glutathionperoxidase; Grx: Glutaredoxin; GSH: Glutathion; GSH1: *gamma*-Glutamyl-cysteinsynthetase; GSH2: Glutathionsynthetase; GSK: Glykogensynthase-Kinase; GspS: Glutathionylspermidinsynthetase; GSSG: Glutathiondisulfid; HEPES-K: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure Kaliumsalz; His-tag: Polyhistidin-Tag; HPLC: Hochleistungsflüssigchromatographie; HRMS: Hochauflösende Massenspektrometrie; HSQC; *heteronuclear single quantum coherence*; IMAC: *immobilized metal ion affinity chromatography*; IPTG: Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid; IR: Infrarot; kDNA: Kinetoplast-Desoxyribonukleinsäure; K<sub>i</sub>: inhibitorische Konstante; KO<sup>t</sup>Bu: Kalium-*tert*-butylat; *L.*: *Leishmania*; LDH: Lactatdehydrogenase; *Li*: *Leishmania infantum*; *Lm*: *Leishmania major*; MOE: *molecular operating environment*; mPMS: 1-Methoxy-5-methylphenazinium-methylsulfat; MS: Massenspektrometrie, MSR: Methioninsulfoxidreduktase; MWM: Molekulargewichtsmarker; NAD<sup>+</sup>: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form; NADH: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form; NADP<sup>+</sup>: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, oxidierte Form; NADPH: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form; NaOAc: Natriumacetat; NMR: Kernresonanzspektroskopie; *N*<sup>X</sup>: Stickstoffatom an Position X des Moleküls; ODC: Ornithindecaboxylase; PATTEC: *Pan African tsetse and trypanosomiasis eradication campaign*; PDB: *protein data bank*; PEP: Phosphoenolpyruvat; Ph: Phenyl; P<sub>i</sub>: anorganisches Phosphat; PK: Pyruvatkinase; PLoS: *public library of science*; PLP: *piecewise linear potential*; PyBOP: Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat; RNA: Ribonukleinsäure; RNU: *relative nephelometric unit*; RO5: Lipinski rule of five; rpm: *revolutions per minute*; RR: Ribonukleotidreduktase; RT: Raumtemperatur; SC, SS: Seitwärtsstreulicht; Schmp.:

Schmelzpunkt; S. D.: Standardabweichung SDS-PAGE: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese; SEC: *size exclusion chromatography*; SI: Selektivitätsindex; SpdS: Spermidinsynthetase; spp.: *species pluralis*; T.: *Trypanosoma*; Tb: *Trypanosoma brucei*; TbAAT6: *Trypanosoma brucei*-Aminosäuretransporter 6; Tc: *Trypanosoma cruzi*; TEA: Triethylamin; TFA: Trifluoressigsäure; THF: Tetrahydrofuran; TLC: *thin layer chromatography*;  $t_M$ : Totzeit;  $t_{M+S}$ : Bruttoretentionszeit; Tpx: Tryparedoxin; *tri-tryp*: *three trypanosomatids* (*Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*); Trx: Thioredoxin; TryR: Trypanothionreduktase; TryS: Trypanothionsynthetase; TS<sub>2</sub>: Trypanothiondisulfid; T(SH)<sub>2</sub>: Trypanothion; UV: Ultraviolett; WHO: *World Health Organization*; WST-1: *water soluble tetrazolium 1*; Zers.: Zersetzung;  $\lambda_{max}$ : Absorptionsmaxima;  $\delta$ : chemische Verschiebung.

## 1. Einleitung

Unter vernachlässigten Tropenkrankheiten werden verschiedene Infektionskrankheiten zusammengefasst, die in der Regel den in Armut lebenden Bevölkerungsteil von Entwicklungsländern betreffen. Diese vernachlässigten Erkrankungen führen bei den Betroffenen zu einem Verlust an ökonomischer Produktivität und Lebensqualität, was sozioökonomische Ungleichheiten verstärkt. Zudem leiden Erkrankte häufig an Stigmatisierung und sozialer Ausgrenzung.<sup>1</sup> Für die Forschung und Entwicklung der pharmazeutischen und medizinischen Chemie im 21. Jahrhundert sind vernachlässigte Tropenkrankheiten weiterhin ein wichtiges Thema. So wurden in der *United Nations Millennium Declaration*<sup>2</sup> acht Ziele formuliert, die sich auf die Bekämpfung von extremer Armut, Hunger und Krankheit bis 2015 beziehen, was in den vergangenen Jahren zu Fortschritten im Kampf gegen AIDS, Tuberkulose und Malaria geführt hat. Andere Erkrankungen, die in vorwiegend tropischen oder subtropischen Gebieten vorkommen, haben zunächst weniger von der Proklamation dieser ambitionierten Ziele profitiert.<sup>3</sup> Jedoch führte die Deklaration zur Einrichtung einer besonderen Abteilung der *World Health Organization* (WHO), als *Global Network for Neglected Tropical Diseases control* bekannt, die die internationale Zusammenarbeit zur Bekämpfung von vernachlässigten Tropenkrankheiten stärken und koordinieren soll. Auch die 2007 eröffnete Publikationsplattform mit öffentlichem Zugang, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, kann als Fortschritt im Kampf gegen entsprechende tropische Infektionskrankheiten gewertet werden.<sup>4</sup> Jährlich sterben mehr als eine halbe Million Menschen<sup>5</sup> an vernachlässigten Tropenkrankheiten in ländlichen Gebieten oder Armenvierteln größerer Städte in den Ländern Asiens, Lateinamerikas und Afrikas.<sup>3</sup> Dabei zielen nur 4% der zwischen 2000 und 2011 zugelassenen Medikamente auf die Therapie von entsprechenden Tropenkrankheiten und weiteren missachteten Infektionskrankheiten ab, obwohl 11% der globalen Krankheitslast entsprechenden Infektionskrankheiten zuzuschreiben sind.<sup>6</sup> Zu den vernachlässigten Tropenkrankheiten werden laut WHO 18 verschiedene Infektionskrankheiten gezählt.<sup>7</sup> Diese werden durch vier Erregergruppen hervorgerufen: Viren, Bakterien, Protozoen und Helminthen. Unter den Protozoen sind es Homoflagellaten der Familie *Trypanosomatidae*, die zu den Tropenkrankheiten Chagas, Afrikanische Schlafkrankheit und Leishmaniose führen.<sup>8</sup> Die hier vorgelegte Arbeit befasst sich mit der Erforschung und Entwicklung von Wirkstoffen gegen diese drei Erkrankungen.

## 1.1 Die Familie *Trypanosomatidae*

Die Klasse *Kinetoplastea* ist unterteilt in zwei Unterklassen mit der Bezeichnung *Prokinetoplastina* und *Metakinetoplastina*, wobei letztere Unterklasse die Ordnung *Trypanosomatida* beinhaltet. Alle Mitglieder der Ordnung *Trypanosomatida* leben parasitär. Zu den wichtigen Mitgliedern der Familie *Trypanosomatidae* zählen die Gattungen *Leishmania* und *Trypanosoma*, die sich heteroxen verhalten, das heißt, sie parasitieren in mehreren Wirtsarten. Neben vielen Spezies der Gattung *Leishmania* sind die Art *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) und die beiden Unterarten *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. brucei gambiense*) und *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. brucei rhodesiense*) humanpathogen.<sup>9</sup> Die folgende morphologische Charakterisierung wird sich auf diese drei humanpathogenen Spezies dieser Eukaryonten beschränken.

Zur Unterscheidung der verschiedenen Morphotypen der Parasiten werden neben biochemischen und ultrastrukturellen Charakteristiken vor allem die Zellgröße und die Zellform herangezogen (Abbildung 1-1). Wichtig ist auch die Lokalisation und Größe des Kinetoplasten-Geißel-Systems einschließlich der Geißeltasche relativ zum Zellkern. Der Kinetoplastid stellt einen DNA-haltigen Teil des langen Mitochondriums dar und ist mit der enthaltenden kDNA spezifisch für Trypanosomatiden. Daneben gibt es weitere Zellorganellen, wie beispielsweise Glykosomen und Reservosomen, die spezifisch für Trypanosomatiden sind, aber für eine weitere Betrachtung wenig Relevanz besitzen. Die protozoischen Parasiten sind auf der Oberfläche mit Polysacchariden, Glykolipiden und Proteinen versehen.<sup>8, 9</sup> Deren Zusammensetzung kann sich teilweise bei der Zellteilung verändern und so den Parasiten vor der immunologischen Abwehr des Wirts schützen.<sup>8</sup>

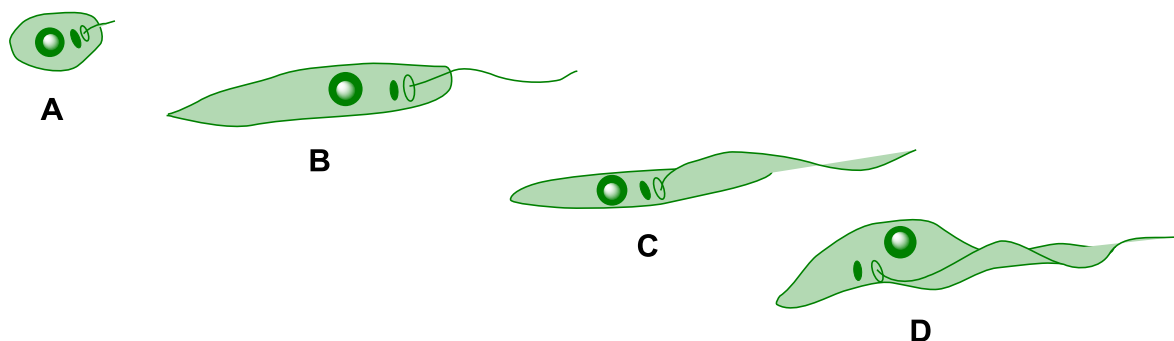


Abbildung 1-1: Morphologische Erscheinungsbilder der Trypanosomatiden. **A:** Amastigote, **B:** Promastigote, **C:** Epimastigote, **D:** Trypomastigote, Kugel: Nukleus, gefüllte Ellipse: Kinetoplast, Ellipse: Geißeltasche. Modifiziert nach HOARE und WALLACE.<sup>10</sup>

## 1.2 Amerikanische Trypanosomiasis

Die Amerikanische Trypanosomiasis, auch Chagas genannt, wird durch den Erreger *T. cruzi* ausgelöst und tritt vorwiegend in ländlichen Gebieten Lateinamerikas auf. 13% der Bevölkerung Lateinamerikas sind dem Risiko einer Chagas-Infektion ausgesetzt und etwa 5.7 Millionen Menschen leiden an dieser Krankheit.<sup>11</sup> Die Infektion führt jährlich zu 7000 Todesfällen.<sup>12</sup>

*T. cruzi* wird außer durch Bluttransfusion, Organtransplantation und dem Verzehr von kontaminierter Nahrung vor allem durch Raubwanzen der Unterfamilie *Triatomae* übertragen. Das Habitat der Raubwanzen stellen unter anderem die Behausungen der potentiell Gefährdeten dar. Bei einer Blutmahlzeit werden die Erreger, wie in Abbildung 1-2 dargestellt, in Form von metazyklischen Trypomastigoten mit dem Kot der Raubwanze ausgeschieden. Einsetzender Juckreiz führt dazu, dass die Parasiten vom menschlichen Wirt in die Wunde gerieben werden und er sich somit selbst infiziert. Die Trypomastigoten befallen Zellen nahe der Wunde, wandeln sich intrazellulär zu Amastigoten um und vermehren sich anschließend in dieser Phase. Nach erneuter Umwandlung zu Trypomastigoten der Blutstromform wird eine Lyse der Zelle forciert und die Trypomastigoten treten in den Blutstrom über. So können sie sich im Organismus verteilen und weitere Zellen infizieren. Bei der nächsten Blutmahlzeit werden diese Blutstrom-Trypomastigoten von der Raubwanze aufgenommen, wo sie sich zunächst zu Epimastigoten umwandeln. In dieser Phase findet die Reproduktion im Mitteldarm des Insekts statt. Während der Migration hin zum Enddarm entwickeln sich aus Epimastigoten metazyklische Trypomastigoten, die mit den Faeces während der Kotabgabe ausgeschieden werden. Somit schließt sich der parasitäre Kreislauf. Als Erregerreservoir der Protozoen kommen vor allem domestizierte oder wilde Säugetiere in Betracht.<sup>13-15</sup>

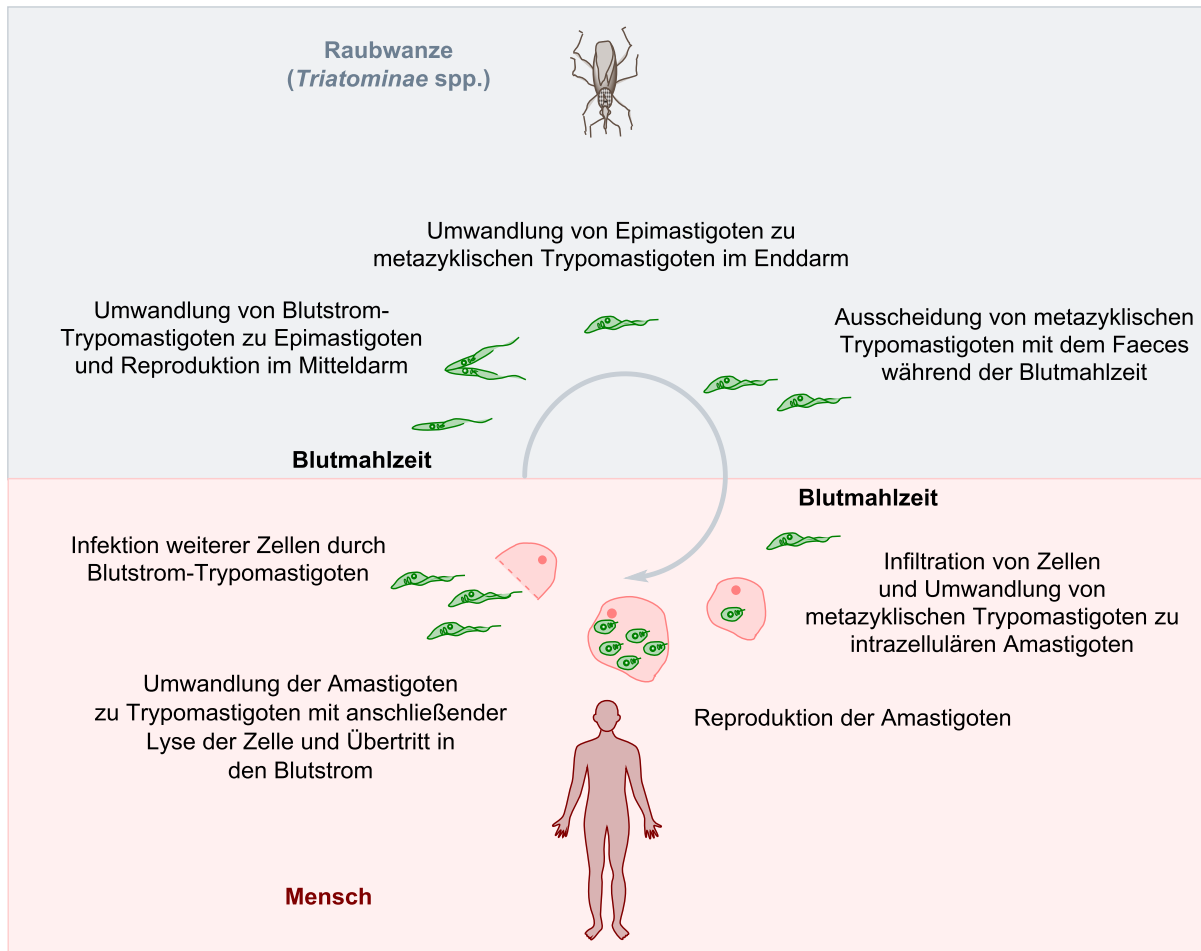


Abbildung 1-2: Lebens- und Vermehrungszyklus von *T. cruzi*-Parasiten. Modifiziert nach STUART *et al.*<sup>15</sup>

Die Erkrankung durchläuft verschiedene klinische Stadien. So kann es nach einer Infektion mit *T. cruzi* zu einer asymptomatisch oder symptomatisch verlaufenden akuten Infektion kommen. Häufige, aber unspezifische Symptome der symptomatischen Infektion sind dabei Unwohlsein, Fieber, Gesichtsödeme, Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie. Tödlich kann die akute Infektion durch Ausbildung einer Myokarditis oder Meningoenzephalitis verlaufen, was auf 5–10% der Fälle bei symptomatischer Infektion zutrifft. Ist eine akute Infektion überwunden, so kommt es zur Ausbildung eines zweiten klinischen Stadiums, der chronischen Infektion, die ebenfalls symptomatisch oder asymptomatisch verlaufen kann. Die symptomatische Verlaufsform entwickeln 10–30% der Infizierten und es kommt dabei vor allem zu einem kardialen und intestinalen Befall. Bei asymptomatischem Verlauf können die Betroffenen über mehrere Jahre infektiös bleiben.<sup>13, 16</sup>

Einen wichtigen Eingriff gegen die Verbreitung der Amerikanischen Trypanosomiasis stellt die Vektorbekämpfung dar. So hat der Einsatz von Insektiziden in Zentral- und Südamerika



deutlich die Ausbreitung von *T. cruzi*-Parasiten eingedämmt. Als Insektizide kamen zunächst Dieldrin und Lindan zum Einsatz. Diese wurden ab den frühen 1980er Jahren durch effektivere synthetische Pyrethroide ersetzt. Als Vorzeigeprojekt der Vektoreindämmung durch insektizide Sprays gilt die Südkegel-Initiative, die 1991 verabschiedet wurde. Durch internationale Kooperation von Argentinien, Bolivien, Brasilien, Chile, Paraguay, Uruguay und später Peru war es möglich, den Wirt *Triatoma infestans* besonders erfolgreich zu bekämpfen. Als Resultat der Initiative konnten Uruguay und Chile in den folgenden Jahren als frei von *Triatoma infestans* ausgewiesen werden.<sup>17</sup>

Als wichtiges Arzneimittel zur Therapie von Chagas ist das Benznidazol (**1**) zu nennen (Abbildung 1-3), welches in die parasitäre RNA-Synthese eingreift und intrazellulär zu einer Konzentrationserhöhung von Superoxiden führt.<sup>18</sup> Das Arzneimittel sollte hierbei in der Phase der akuten Infektion eingesetzt werden, um eine optimale Wirkung zu erzielen. Aber auch chronisch Infizierte können von einer Therapie mit Benznidazol profitieren, weil das Therapeutikum die Entstehung einer Kardiomyopathie hinauszögern oder deren Progression abschwächen kann.<sup>18, 19</sup> Zudem wird an der Implementierung einer pädiatrischen Arzneiform gearbeitet.<sup>20</sup> Aufgrund schlechter Wasserlöslichkeit wird Benznidazol nach dem biopharmazeutischen Klassifizierungssystem der Klasse 4 zugeordnet. Zudem werden hohe Tagesdosen von 5–7 mg/kg für Erwachsene und 10 mg/kg für Kinder oral verabreicht und das über einen langen Zeitraum von 60 Tagen.<sup>19</sup> Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen, die im Zusammenhang mit den hohen Tagesdosen und der langen Therapiedauer stehen,<sup>19</sup> treten Myelosuppression, periphere Neuropathien und Immunreaktionen, wie exfoliative Dermatitis auf.<sup>14, 18, 19</sup>

Neben dem Benznidazol steht das Nitrofuranderivat Nifurtimox (**2**) als Arzneimittel für die Behandlung einer Chagas-Infektion zur Verfügung (Abbildung 1-3). Nifurtimox wirkt antiparasitär über Radikalentstehung und einer intrazellulären Konzentrationserhöhung von Superoxiden. Auch Nifurtimox sollte in der akuten Phase der Infektion eingesetzt werden und ist oral verfügbar. Als Tagesdosen werden 8–10 mg/kg für Erwachsene und 15–20 mg/kg für Kinder, aufgeteilt in mehrere Einzeldosen, empfohlen. Wie auch beim Benznidazol ist die Therapiedauer mit 60–90 Tagen sehr lang. Im Vergleich zum Benznidazol zeigt das Nifurtimox eine höhere Toxizität. Neben gastrointestinalen Beschwerden kann es unter der Therapie zu zentralnervösen Störungen wie Polyneuritis, Verwirrheitszuständen, fokalen oder generalisierten epileptischen Anfällen und zur Entstehung einer Psychose nach Therapieende kommen. Zudem kann sich bei Patienten mit Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Mangel eine hämolytische Anämie ausbilden.<sup>14, 18, 19</sup>

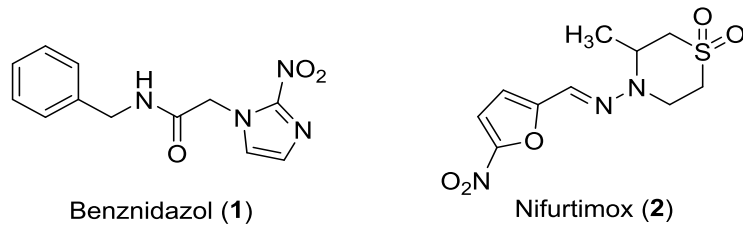


Abbildung 1-3: Arzneistoffe zur Therapie der Amerikanischen Trypanosomiasis.

Hoffnung auf Alternativen zu Benznidazol und Nifurtimox gaben zunächst zwei Vertreter der Azol-Antimykotika, die in Abbildung 1-4 dargestellt sind. Posaconazol (3) und E1224 (4), ein Prodrug des Ravuconazols, zeigten in präklinischen Studien gute Aktivität gegen *T. cruzi*-Parasiten, waren jedoch in klinischen Studien dem Benznidazol unterlegen.<sup>21, 22</sup> In klinischer Erprobung befindet sich zurzeit Fexinidazol (5, Abbildung 1-4), welches bei einer Studie in Bolivien gegen die chronische Chagas-Infektion eingesetzt wird.<sup>23</sup>

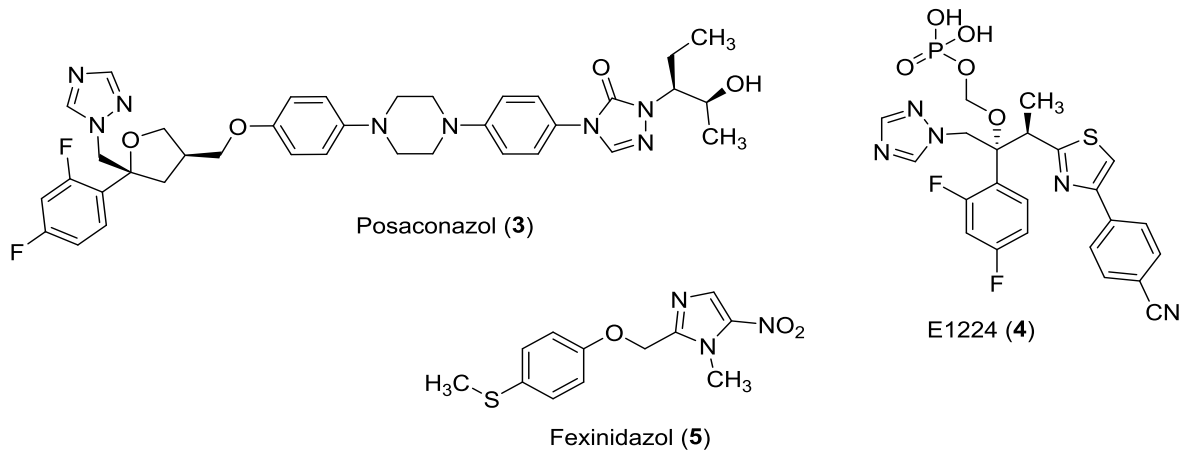


Abbildung 1-4: Aktive Substanzen aus klinischen Studien zur Therapie der Amerikanischen Trypanosomiasis.

### 1.3 Afrikanische Trypanosomiasis

Die humane Afrikanische Trypanosomiasis ist auch unter der Bezeichnung Afrikanische Schlafkrankheit bekannt und wird durch zwei Unterarten von *T. brucei* ausgelöst. Die Parasiten werden durch den Stich von Tsetse-Fliegen, die der Gattung *Glossina* zugeordnet werden, übertragen.<sup>24</sup> Die Infektionskrankheit tritt in 36 afrikanischen Ländern südlich der Sahara auf. Insgesamt ist die Anzahl an Neuinfektionen rückläufig. So wurden 2009 erstmals seit 50 Jahren weniger als 10000 Neuinfektionen gezählt und 2015 wurden nur 2804 Fälle von Afrikanischer Schlafkrankheit registriert.<sup>25</sup> Dennoch sind 21 Millionen Menschen in Afrika dem Risiko einer Infektion ausgesetzt<sup>26</sup> und unbehandelt ist diese tropische Infektionskrankheit stets letal.<sup>24</sup>

Durch die Unterart *T. brucei rhodesiense* wird ein akuter Krankheitsverlauf hervorgerufen, wobei die Verbreitung des Erregers auf Ostafrika beschränkt ist. Ein chronisches Krankheitsgeschehen wird durch *T. brucei gambiense* ausgelöst. Dieser Parasit ist in West- und Zentralafrika anzutreffen. Tsetse-Fliegen, die für beide Unterarten Vektoren darstellen, sind mit 31 Arten und Unterarten in Afrika vertreten.<sup>24</sup> Bei dem Stich der Fliege werden metazyklische Trypomastigoten in den Mensch injiziert. Diese wandeln sich zu Blutstrom-Trypomastigoten um und verbreiten sich vom Lymphsystem über das Blut im Organismus. In der Lymphe und im Blut kommt es auch zur Replikation dieser Form. Die Blutstrom-Trypomastigoten treten hierbei in zwei verschiedenen morphologischen Formen auf: Als schlankes Erscheinungsbild (*slender*-Form) und zu einem geringen Teil als gedrungenes Erscheinungsbild (*stumpy*-Form). Die *stumpy*-Form ist im menschlichen Organismus nicht vermehrungsfähig und stirbt nach wenigen Tagen. Nachdem dieses erste Stadium der Erkrankung durchlaufen ist, überwindet der Parasit die Blut-Hirn-Schranke und infiltriert das zentrale Nervensystem, wodurch das zweite Stadium der Erkrankung erreicht wird. Im zentralen Nervensystem persistiert der Parasit in der Cerebrospinalflüssigkeit und in interzellulären Räumen. Bei der nächsten Blutmahlzeit einer Tsetse-Fliege werden Blutstrom-Trypomastigoten mit dem Blut aufgenommen und Trypomastigoten der *stumpy*-Form transformieren zu prozyklischen Trypomastigoten im Darm des Parasiten. In dieser Form kommt es auch zur Replikation. Prozyklische Trypomastigoten können den Darm verlassen und sich in den Speicheldrüsen der Fliegen festsetzen. In den Speicheldrüsen kommt es zu einer Umwandlung zu Epimastigoten mit sich anschließender Vermehrung. Nach einer Transformation der Epimastigoten zu metazyklischen Trypomastigoten ist die Fliege infektiös (Abbildung 1-5).<sup>15, 27</sup>

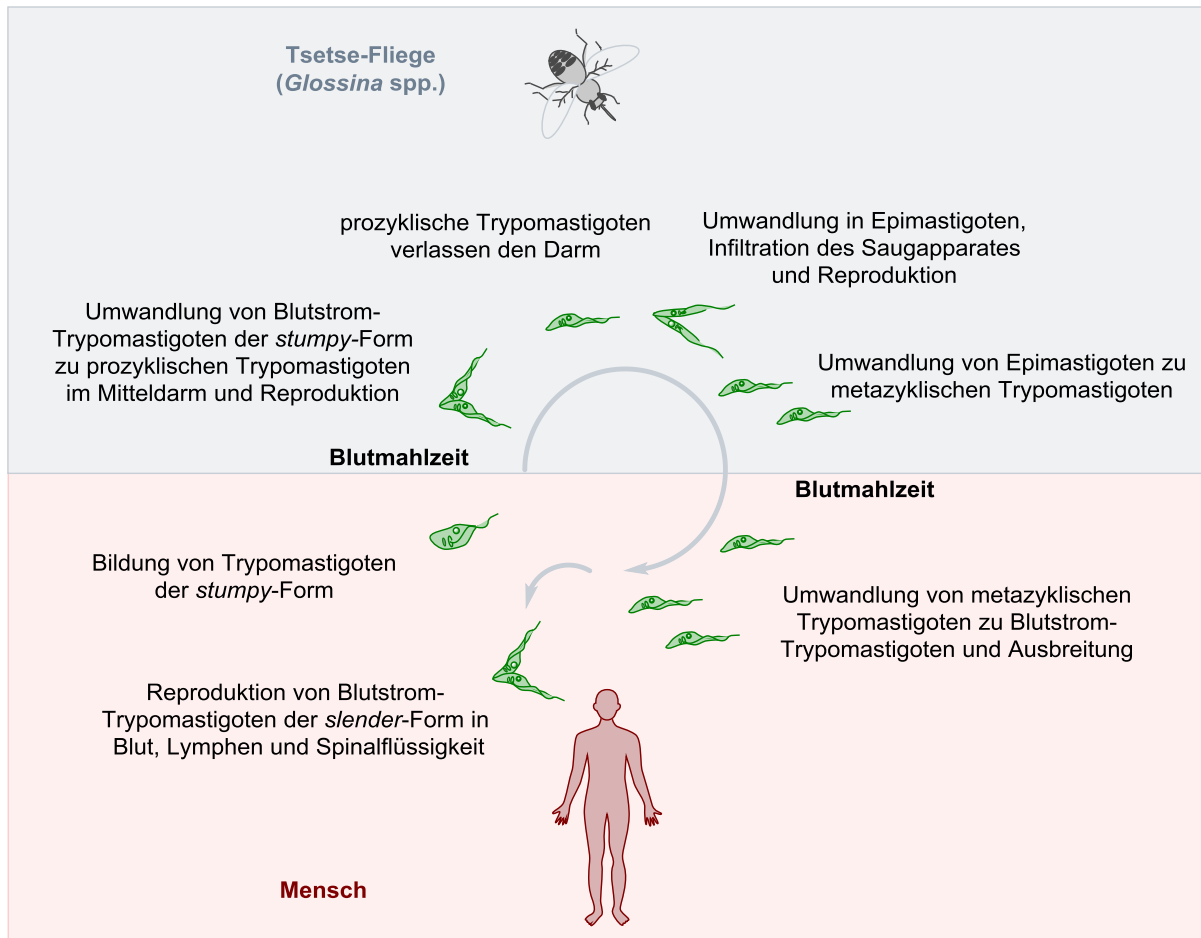


Abbildung 1-5: Lebens- und Vermehrungszyklus von *T. brucei rhodesiense* und *T. brucei gambiense*. Modifiziert nach STUART *et al.*<sup>15</sup> und DUSZENKO<sup>27</sup>.

Nach einer Infektion mit der Afrikanischen Schlafkrankheit bildet sich zunächst an der Einstichstelle eine starke Schwellung, die auch als Schanker bezeichnet wird. Dieser Schanker entwickelt sich wieder zurück. Außerdem kommt es zu einer charakteristischen Schwellung im Nacken, als Winterbottom-Zeichen bekannt. Zudem treten im ersten Krankheitsstadium unspezifische Symptome wie Fieber und Gliederschmerzen auf. Hat der Parasit die Blut-Hirn-Schranke überwunden, bildet sich eine Enzephalopathie aus, welche für die Namensgebung der Erkrankung verantwortlichen Symptome hervorruft: Müdigkeit, Lethargie und später Somnolenz. Unbehandelt endet dieses zweite Krankheitsstadium mit dem Tod.<sup>24, 27</sup>

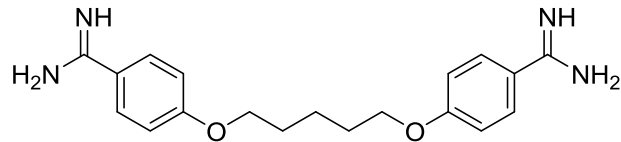
Ursächlich für den Rückgang der Neuinfektionen der vergangenen Jahre sind sowohl Programme zur Kontrolle der parasitären Vektoren als auch Arzneimittelspenden der pharmazeutischen Industrie.<sup>15, 28</sup> Im Jahr 2002 wurde von den Regierungen der afrikanischen Länder eine Initiative gegründet, die auf die Eradikation der Tsetse-Fliegen-Population ausgerichtet ist. Sie ist unter der Bezeichnung *Pan African Tsetse and Trypanosomiasis*

*Eradication Campaign*, kurz PATTEC, bekannt.<sup>29</sup> Im Rahmen solcher Kooperationen wurde durch gezielten Einsatz von Insektiziden, Fallen und sterilisierten Fliegen die Ausbreitung von Tsetse-Fliegen eingedämmt.<sup>15, 28</sup>

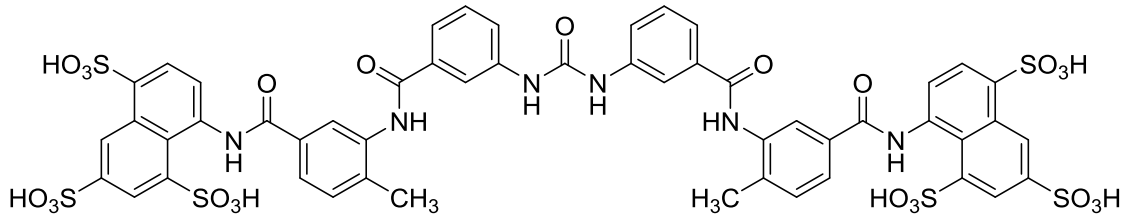
Für die Therapie der Afrikanischen Trypanosomiasis stehen derzeit fünf Arzneimittel zur Verfügung, wobei eine zunehmende Resistenzentwicklung und eine teilweise erhebliche Toxizität der eingesetzten Medikamente die Therapie erschweren. Zudem kann eine parenterale Applikation, die bei einigen Medikamenten nötig ist, in den ländlichen Gebieten Afrikas nicht immer sicher gewährleistet werden.<sup>14</sup>

Für das erste Stadium der Erkrankung stehen für eine *T. brucei gambiense*-Infektion Pentamidin (6) und für eine *T. brucei rhodesiense*-Infektion Suramin (7) zur Verfügung (Abbildung 1-6). Das Pentamidin, welches bereits seit den 1940er Jahren zum Einsatz kommt, wird mit einer Dosis von 4 mg/kg täglich intramuskulär über einen Zeitraum von 7 Tagen verabreicht. Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen treten, neben lokalen Reaktionen an der Injektionsstelle, Hypoglykämie, Leukopenie und Nierentoxizität auf.<sup>14</sup> Die Wirkung des Pentamidins beruht möglicherweise auf einer Interaktion mit der Parasiten-DNA oder -RNA. Eine Enzymhemmung in den Parasitenmitochondrien mit Einfluss auf das Membranpotential wird ebenfalls diskutiert.<sup>30</sup> Da Pentamidin durch drei verschiedene Transporter, unter anderem auch den Aminopurin-P2-Transporter, in den Parasiten aufgenommen wird, ist eine Resistenzentwicklung unwahrscheinlich. Ein Nichtansprechen auf die Therapie ist meistens auf eine Fehldiagnose des Krankheitsstadiums zurückzuführen.<sup>30</sup>

Das Suramin wurde erstmals 1922 gegen die Afrikanische Schlafkrankheit eingesetzt.<sup>14</sup> Aufgrund der sechs sauren funktionellen Gruppen ist die Verbindung schlecht membrangängig. Folglich kann sie nur unzureichend enteral resorbiert werden und kann nicht in ausreichendem Maß in das zentrale Nervensystem penetrieren.<sup>30</sup> Die Applikation erfolgt als langsame intravenöse Infusion, einmal alle 3–7 Tage über 4 Wochen. Der Arzneistoff wird vermutlich mittels rezeptorvermittelter Endozytose in den Parasiten aufgenommen.<sup>14</sup> Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen treten unter anderem Neuropathien, Anämie, Fatigue, Hyperglykämie, Neutropenie, Koagulopathie und renale Insuffizienz auf.<sup>31</sup> Der Wirkungsmechanismus des Suramins ist nicht bekannt. Aufgrund der sechs negativen Ladungen, die der Arzneistoff bei physiologischem pH-Wert trägt, kommt es zur Wechselwirkung mit vielen Enzymen. Eine Interaktion des Arzneistoffes mit der parasitären Glykolyse wird diskutiert.<sup>30, 31</sup>



Pentamidin (6)



Suramin (7)

Abbildung 1-6: Arzneistoffe zur Behandlung des ersten Stadiums der Afrikanischen Trypanosomiasis.

Im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit ist im Fall einer Infektion mit *T. brucei rhodesiense* das arsenhaltige Melarsoprol (8), das in Abbildung 1-7 gezeigt wird, die einzige Therapieoption. Die dreiwertige Arsenverbindung Melarsoprol wurde bereits 1949 als Therapeutikum eingeführt. Die Standardtherapie besteht aus einer täglichen Injektion von 2.2 mg/kg Melarsoprol über 10 Tage.<sup>31</sup> Der Arzneistoff ist schwer wasserlöslich und muss als 3.6%ige Lösung in Propylenglycol appliziert werden. Zudem ist er instabil und zerfällt rasch. Da Melarsoprol in akzeptablem Ausmaß die Blut-Hirn-Schranke überwindet, kann es Parasiten im zentralen Nervensystem effektiv abtöten. Während Melarsoprol selber durch Diffusion in den Parasiten gelangt, wird sein aktiver Metabolit Melarsenoxid (9) über den Aminopurin-P2-Transporter in den Parasiten aufgenommen. Melarsenoxid kann kovalent an Proteine binden. So wird Trypanothion, ein dem Glutathion ähnliches Molekül, von Melarsenoxid gebunden, was wiederum die Trypanothionreduktase (TryR) hemmt. Ein Defekt am Aminopurin-P2-Transporter kann den Parasiten resistent gegenüber Melarsoprol machen. Hiermit werden auch häufige Therapieversager begründet.<sup>30</sup> Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen des Melarsoprols sind gravierend. So wird eine reaktive Enzephalopathie, die 5–10% der Patienten betrifft, gefürchtet. Diese endet für die Betroffenen nicht selten letal. Daneben treten neurologische Ausfälle, Krampfanfälle, Kopfschmerzen und eine Thrombozytopenie auf.<sup>31</sup>

Mehr als 95% der Patienten im zweiten Stadium der Erkrankung sind jedoch mit *T. brucei gambiense* infiziert, sodass Eflornithin (10) verwendet werden kann (Abbildung 1-7). Eflornithin wird auch in der Kombinationstherapie mit Nifurtimox

eingesetzt.<sup>14</sup> Die Therapie mit Eflornithin besteht aus einer intravenösen Infusion, die mit einer Dosis von 100 mg/kg alle 6 h appliziert wird. Die kurze Halbwertszeit (ca. 3 h) und die geringe Potenz des Arzneistoffs machen eine wiederholte Applikation nötig. Die Therapiedauer beträgt dabei 14 Tage. Eflornithin inhibiert die Ornithindecaboxylase, welche essentiell für die Polyaminbiosynthese ist. Auch der Mensch besitzt die Ornithindecaboxylase, die jedoch im Vergleich zum Parasiten schneller exprimiert und zur Verfügung gestellt werden kann, woraus sich die Selektivität des Arzneimittels ergibt. Die Aufnahme des Eflornithins in den Parasiten erfolgt durch den Aminosäuretransporter TbAAT6. Zunehmende Resistenzen sind in dem Ausfall des Transporter-Systems begründet. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen treten in Form von Fieber, Kopfschmerzen, gastrointestinalen Beschwerden, sowie peripheren Neuropathien und Tremor auf. Durch eine Kombinationstherapie von Eflornithin mit dem oral verfügbaren Nifurtimox (**2**), welches über 10 Tage eingenommen wird, verkürzt sich die Infusionstherapie deutlich. In der Kombinationstherapie wird eine Infusion mit verdoppelter Dosis von 200 mg/kg nur alle 12 h erforderlich und die Infusionstherapie kann bereits nach 7 Tagen eingestellt werden. Dieses Behandlungsverfahren hilft Kosten und Ressourcen zu sparen und macht das Regime zur Therapie der ersten Wahl.<sup>14</sup>

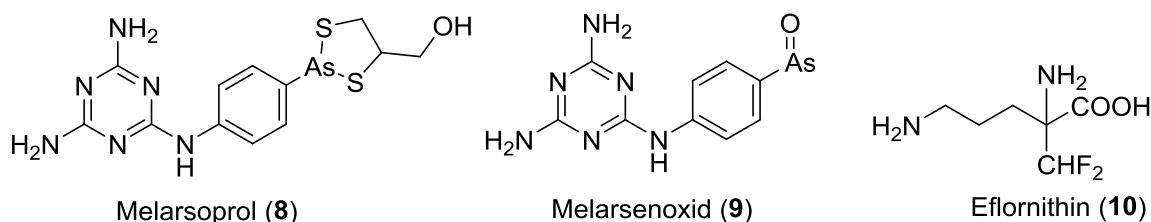


Abbildung 1-7: Arzneistoffe zur Behandlung des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit einschließlich Melarsenoxid als aktiven Metaboliten des Melarsoprols.

In klinischer Erprobung befinden sich derzeit zwei Testsubstanzen, die beide für die Therapie des zweiten Stadiums der Afrikanischen Trypanosomiasis vorgesehen sind. Das Nitroimidazol Fexinidazol (**5**), das metabolisch zum Sulfoxid und Sulfon aktiviert wird, zeichnet sich durch Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit aus und wird in Studien getestet, die von der *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) unterstützt werden. Außerdem wird die Benzoxaborol-Verbindung SCYX-7158 (**11**) in klinischen Studien erprobt. Die Struktur SCYX-7158 ist in Abbildung 1-8 dargestellt. Die Verbindung ergab sich aus einer Kooperation von Anacor Pharmaceuticals, SCYNEXIS und DNDi.<sup>14, 32, 33</sup> Klinische Studien einer weiteren zunächst erfolgsversprechenden Substanz, dem Parfuramidin (**12**, Abbildung 1-8), wurden aufgrund von auftretender Nephrotoxizität 2008 eingestellt. Parfuramidin wird auch unter der Abkürzung DB-289 geführt.<sup>33</sup>

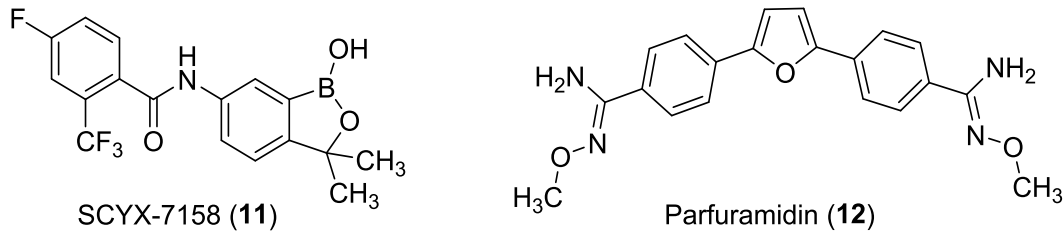


Abbildung 1-8: Aktive Verbindungen aus klinischen Studien zur Therapie der humanen Afrikanischen Trypanosomiasis.

## 1.4 Leishmaniose

Die Leishmaniose wird durch Parasiten der Gattung *Leishmania* hervorgerufen, wobei über 20 Arten als humanpathogen gelten. Sie werden durch den Stich der weiblichen Sandfliegen (*Phlebotomus* spp. und *Lutzomyia* spp.) übertragen. Es werden drei verschiedene klinische Krankheitsformen unterschieden: Die viszerale, die kutane und die mukokutane Leishmaniose.<sup>15, 34</sup> Bei der viszeralen Leishmaniose, auch Kala-Azar genannt, kommt es zu einer generalisierten Infektion mit *Leishmania*-Parasiten. Bei der kutanen Leishmaniose, auch unter dem Namen Orient- oder Aleppobeule bekannt, wird nur die Haut infiziert. Die mukokutane Leishmaniose tritt in der Regel als Komplikation der kutanen Leishmaniose auf. Es kommt beim Auftreten dieses Syndroms zum Befall der Schleimhaut und der Knorpelsubstanz im Nasen-Rachenbereich. Die mukokutane Leishmaniose ist auch unter der Bezeichnung Espundia bekannt.<sup>35</sup> Die Leishmaniose tritt endemisch in 98 Ländern auf, wobei die viszerale Leishmaniose vor allem auf Bangladesch, Brasilien, Äthiopien, Indien, Südsudan und Sudan begrenzt ist. Das Ausbreitungsgebiet der kutanen Leishmaniose ist groß, so zählen Amerika, der Mittelmeerraum und Westasien zum Einzugsgebiet der Infektionserkrankung.<sup>34</sup> Schätzungsweise sind 0.2 bis 0.4 Millionen neue Fälle an viszeraler Leishmaniose und 0.7 bis 1.2 Millionen neue Fälle an kutaner Leishmaniose jährlich zu verzeichnen.<sup>34</sup> Bei der Blutmahlzeit der Sandfliege werden metazyklische Promastigoten in die Haut des Menschen inokuliert. Diese Promastigoten werden durch eine rezeptorgesteuerte Endozytose von Makrophagen aufgenommen, wandeln sich zu nicht-begeißelten Amastigoten um und reproduzieren sich. Durch die infizierten Makrophagen erfolgt im Fall der viszeralen Leishmaniose der Transport zu weiteren Organen. Im Folgenden kommt es zur Infektion weiterer Zellen. Während der nächsten Blutmahlzeit werden infizierte Makrophagen von der Sandmücke aufgenommen und verdaut. Die Amastigoten werden freigesetzt und transformieren zu Promastigoten im Mitteldarm des



Insekts. Anschließend findet die Vermehrung statt. Die Promastigoten migrieren zur Speicheldrüse des Vektors und wandeln sich zu humaninfektiösen metazyklischen Promastigoten um. Diese werden bei der nächsten Blutmahlzeit auf den Menschen übertragen und der Infektionskreis schließt sich (Abbildung 1-9).<sup>15, 35</sup>

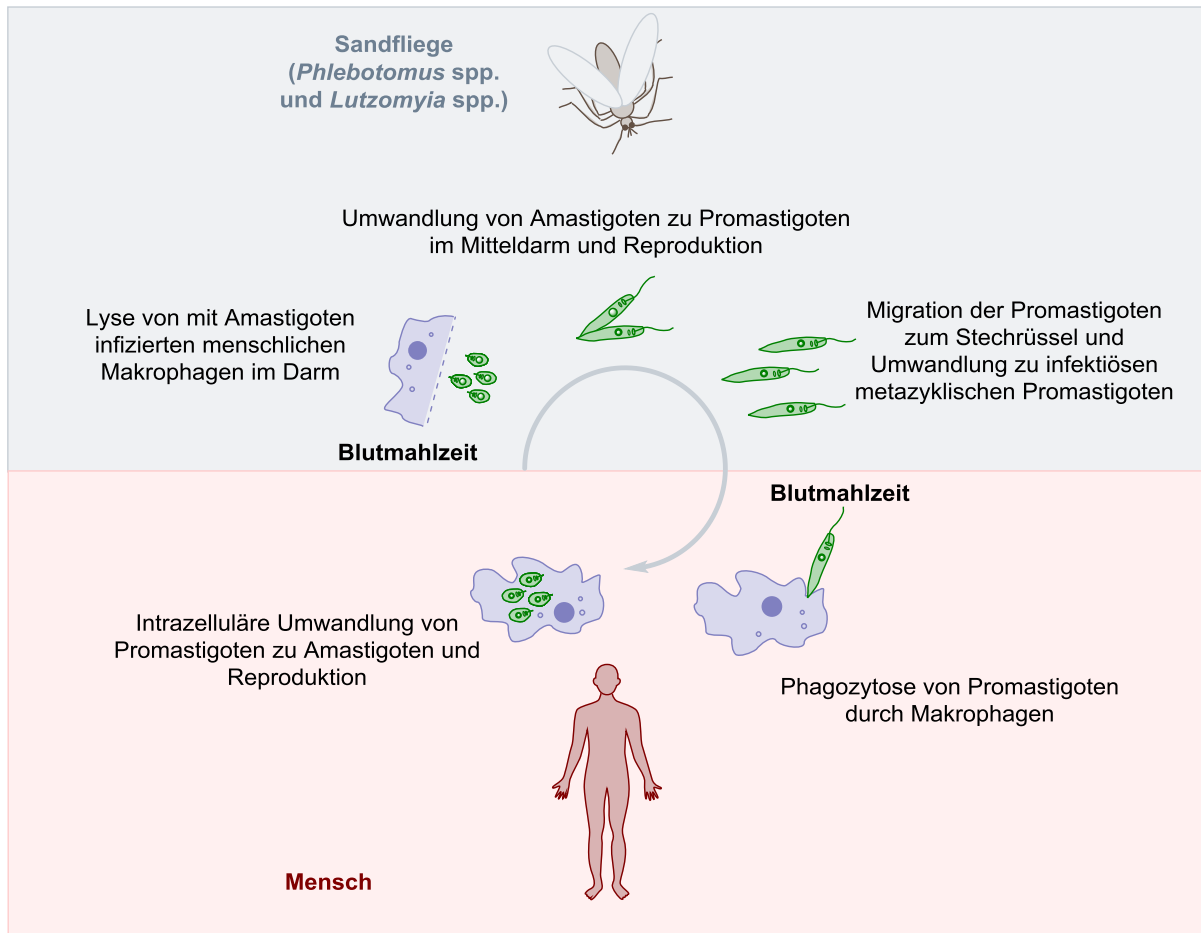


Abbildung 1-9: Lebens- und Vermehrungszyklus von *Leishmania*-Parasiten. Modifiziert nach STUART *et al.*<sup>15</sup>

Die klinischen Symptome der Leishmaniose lassen sich nach den drei typischen Syndromen aufgliedern. So ist die kutane Leishmaniose vor allem durch eine offene Wunde an der Einstichstelle und Hautläsionen gekennzeichnet, häufig in Kombination mit einer bakteriellen Sekundärinfektion. Bei der mukokutanen Leishmaniose kommt es zur Zerstörung des Nasen-Rachenraumes ausgehend von einem Geschwür an der Nase, das sich hin zur Oberlippe entwickelt. Da diese Zerstörung das Schlucken behindert, sind die Patienten gefährdet, an einer Aspirationspneumonie zu erkranken. Bei der viszerale Leishmaniose entwickelt sich einige Monate nach einer Hautläsion eine akute systemische Entzündung, meist unter Beteiligung von Leber und Milz. Eine Bronchopneumonie bei einer Infektion der Lunge und Darmentzündungen bei Befall des Gastrointestinaltraktes können auftreten.

Eine dunkle Verfärbung im Hand- und Fußbereich tritt in einigen Fällen auf, was für die Namensgebung der Erkrankung verantwortlich ist. Kala-Azar bedeutet schwarze Krankheit. Unbehandelt endet die viszerale Leishmaniose häufig durch Blutungen und Sekundärinfektionen tödlich.<sup>14, 35</sup>

Zur Standardtherapie von viszeraler und kutaner Leishmaniose zählen seit mehr als 70 Jahren die pentavalenten Antimonverbindungen Meglumin-Antimonat (**13**, Glucantime®) und Natrium-Stibogluconat (**14**, Pentostam®) sowie deren Generika. Wie in Abbildung 1-10 gezeigt, stellen die Verbindungen Komplexe aus pentavalentem Antimon mit Polyolen dar, die gut wasserlöslich sind. Auf Grund ihrer hydrophilen Eigenschaften müssen sie parenteral appliziert werden. Nach Applikation wird das fünfwertige Antimon zum aktiven dreiwertigen Antimon reduziert und hemmt die TryR, die an der Bereitstellung des Thiols Trypanothion beteiligt ist. Von verschiedenen Resistenzmechanismen wird berichtet. Von Bedeutung scheint dabei zu sein, dass die Konzentration an aktivem dreiwertigem Antimon im Parasiten verringert wird, zum Beispiel, indem weniger dreiwertiges Antimon gebildet wird oder dreiwertiges Antimon schneller eliminiert wird. Von klinischer Relevanz ist die Resistenz gegenüber den fünfwertigen Antimonverbindungen in Bihar, Indien. Hier ist deren Anwendung weitgehend obsolet, da die Patienten mit viszeraler Leishmaniose nur noch selten auf eine Therapie ansprechen. Neben zunehmender Resistenzentwicklung stellen auch unerwünschte Arzneimittelwirkungen, wie Hepatotoxizität, Nephrotoxizität und Kardiotoxizität, ein Problem dar. Außerdem ist die Therapie mit bis zu 30 Tagen sehr lang.<sup>14,</sup>

36

Neben den pentavalenten Antimonverbindungen ist Amphotericin B (**15**, Abbildung 1-10) ein bedeutsames Arzneimittel bei der Therapie der viszeralen und kutanen Leishmaniose und gehört zur ersten Wahl in Bihar. Das Polyen-Antibiotikum, welches auch zur Therapie systemischer Mykosen eingesetzt wird, wird als liposomale Formulierung (AmBisome®) in Form einer Infusion appliziert. Es interagiert mit dem Ergosterol der Parasitenmembran und führt zur Porenbildung in der Membran, was die Zellintegrität aufhebt. Der Parasit stirbt ab. Neben der Nephrotoxizität, die durch die liposomale Formulierung gesenkt wird, sind die sehr hohen Arzneimittelkosten von Nachteil. Verhandlungen der WHO mit dem Hersteller (Gilead) konnten den Preis deutlich reduzieren.<sup>14, 36, 37</sup>

Seit über 40 Jahren ist Pentamidin (**6**) als antileishmaniell Therapeutikum verfügbar. Es ist allerdings nur für spezifische Fälle von kutaner Leishmaniose in Südamerika einsetzbar.<sup>37</sup> Aufgrund der polaren Eigenschaften des Bisamidins muss es parenteral appliziert werden. Es wirkt möglicherweise über eine Interaktion mit der DNA, durch Inhibition der Polyamin-Synthese oder über eine Interaktion mit den parasitären Mitochondrien. Als unerwünschte

Arzneimittelwirkungen treten neben gastrointestinalen Beschwerden, Hypotension und Nephrotoxizität auch Hypoglykämien auf.<sup>14, 36</sup>

Nach langwierigen Studien ist Paromomycin (**16**) als ein Vertreter der polaren Aminoglykosid-Antibiotika als Arzneimittel gegen die viszerale Leishmaniose in Indien verfügbar (Abbildung 1-10). Klinische Studien in Indien zeigten sehr gute Heilungsraten von 94%, wohingegen Untersuchungen mit gleicher Dosierung in Ostafrika dem Arzneimittel eine deutlich geringere Wirkung zuschrieben.<sup>14</sup>

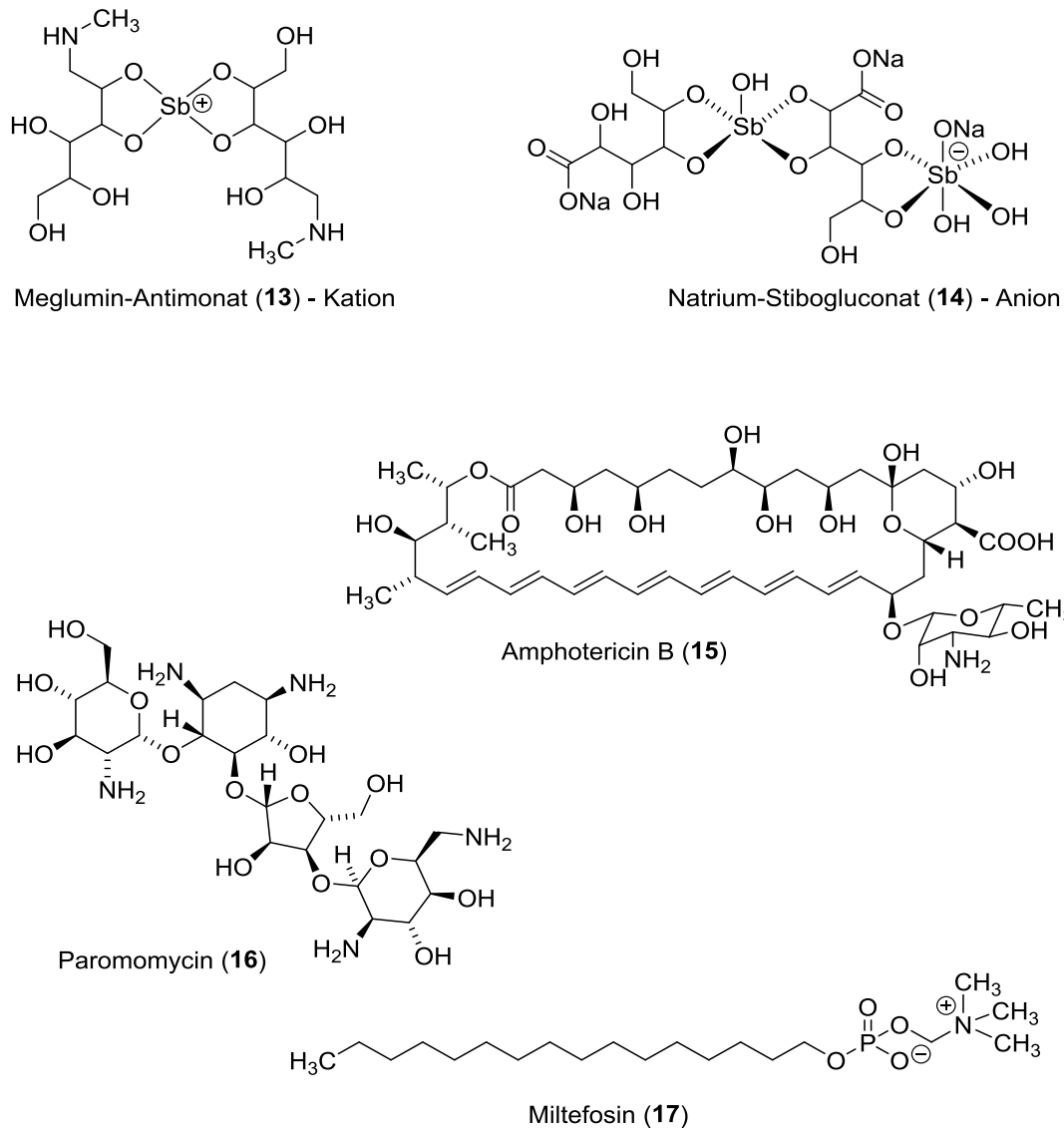


Abbildung 1-10: Eingesetzte Arzneistoffe zur Behandlung der Leishmaniose.

Aufgrund der polaren Eigenschaften muss Paromomycin ebenfalls parenteral gegeben werden. Es zeigt neben Hepatotoxizität auch reversible Ototoxizität, die typisch für die Substanzklasse ist. Die bei Aminoglykosiden auftretende Nephrotoxizität konnte beim

Paromomycin nicht bestätigt werden. Der Wirkungsmechanismus ist nicht aufgeklärt, doch wird vermutet, dass die Substanz sich, wie auch bei Bakterien, an die Ribosomen des Parasiten bindet. Die Translation wird anschließend fehlgeleitet. Zudem stört Paromomycin die Zellatmung der Parasiten. Neben der kostengünstigen parenteralen Applikation steht auch eine topische Formulierung von Paromomycin in Kombination mit Methylbenzethoniumchlorid (Leshcutan®) zur Behandlung der kutanen Leishmaniose zur Verfügung.<sup>36–38</sup>

Das auch antineoplastisch wirksame Miltefosin (**17**) zählt als Alkylglycerophosphocholin zu den Phospholipiden (Abbildung 1-10). Es ist zur Therapie der viszeralen Leishmaniose oral verfügbar und seit 2002 in Indien zugelassen. Zulassungen in weiteren Ländern folgten rasch. Ein großer Nachteil des Arzneistoffs ist seine Teratogenität. Auf eine Kontrazeption bei Frauen im gebärfähigen Alter ist zu achten. Diese muss für drei Monate nach Therapieende aufrecht erhalten werden, da der Arzneistoff eine sehr hohe Halbwertszeit (150 h) aufweist. Zudem kann das lange Therapieregime von 28 Tagen zu Compliance-Problemen führen. Es wird befürchtet, dass es zunehmend zur Entstehung von Resistenzen kommen wird.<sup>36, 37, 39</sup>

Neue Wirkstoffe gegen die viszerale Leishmaniose sind derzeit nicht in klinischer Erprobung. Allerdings werden Kombinationstherapien, bei denen bereits etablierte antileishmanielle Arzneimittel kombiniert werden, in klinischen Studien getestet. Ziel dabei ist es, sowohl die Therapiedauer als auch die eingesetzten Dosen zu verringern. Zudem erhofft man sich weniger unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Resistenzen.<sup>14</sup> So wurden in Indien AmBisome® mit Miltefosin oder Paromomycin und Miltefosin mit Paromomycin erfolgreich getestet.<sup>14, 40</sup> Die Heilungsrate betrug dabei 98% mit einer deutlich reduzierten Therapiedauer von 8 Tagen bei der AmBisome®-Mildefosin-Kombinationstherapie.<sup>14</sup> In Afrika wurde auch Natrium-Stilboglucolat in Kombination mit AmBisome® und Paromomycin getestet.<sup>41</sup> Die Kombination von Natrium-Stilboglucolat mit Paromomycin zeigte dabei ein gutes Sicherheitsprofil mit vergleichbarer Effizienz zur Natrium-Stilboglucolat-Monotherapie und das bei deutlich verkürzter Therapiedauer von 17 Tagen.<sup>42</sup> Klinische Studien zum oralverfügbaren 8-Aminochinolin Sitamaquin (**18**, Abbildung 1-11) wurden beendet, da die Heilungsrate mit unter 90%<sup>37</sup> zu gering war, zudem erwies sich die Substanz als nephrotoxisch.<sup>43</sup>

Aus klinischen Studien gibt es Hinweise, dass sich Azol-Antimykotika wie Fluconazol (**19**), Itraconazol (**20**) und Posaconazol (**3**) positiv auf eine kutane *Leishmania*-Infektion auswirken. Zudem ist die Anwendung von antiinflammatorisch wirkendem Pentoxifyllin (**21**) als Adjuvans bei einer Antimon-Therapie von kutaner Leishmaniose vorteilhaft (Abbildung 1-11).<sup>31, 37</sup>

In einer Studie in Peru wurde die Wirksamkeit von Imiquimod (**22**, Abbildung 1-11) als adjuvanter Immunmodulator additiv zu pentavalenten Antimonverbindungen klinisch getestet. Es gab ein besseres Abschneiden der Testgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Placebo plus pentavalente Antimonverbindung), allerdings war der Unterschied statistisch nicht signifikant.<sup>44</sup> Außerdem wird in einer klinischen Studie die topische Anwendung von Amphotericin B (**15**) bei kutaner Leishmaniose getestet. Das Ergebnis der Studie steht noch aus.<sup>41</sup>

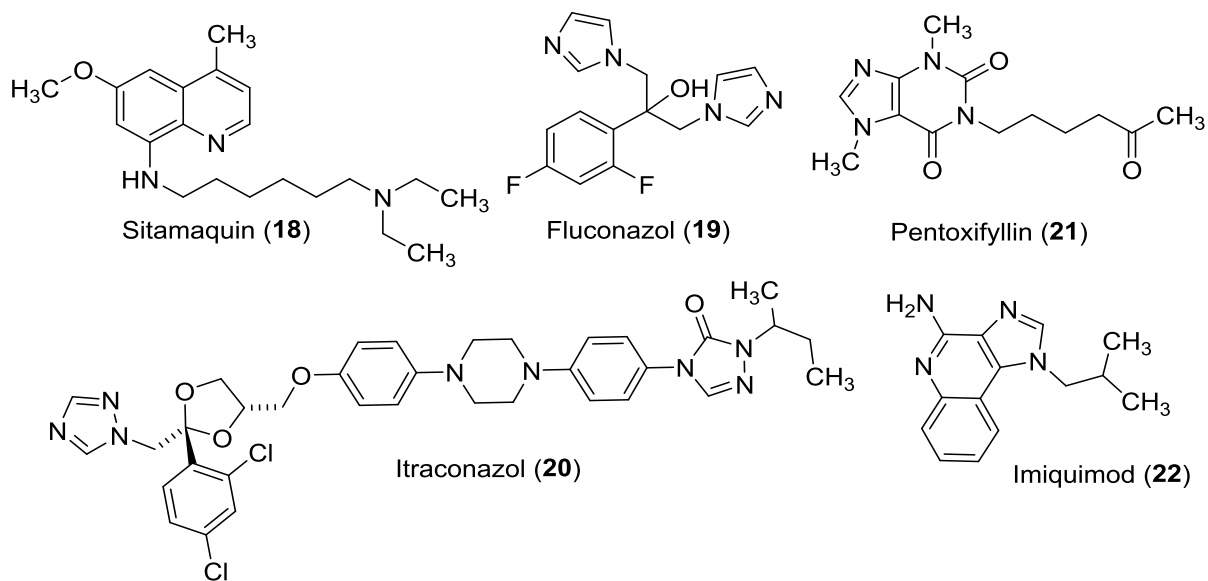


Abbildung 1-11: Arzneistoffe aus klinischen Studien zur Therapie der Leishmaniose.

## 1.5 Das Trypanothion

Eine wichtige Schlüsselfunktion im Redox-Metabolismus der protozoischen Parasiten aus der Ordnung *Trypanosomatida* kommt dem Dithiol Trypanothion zu. Es wurde 1985 von FAIRLAMB und CERAMI<sup>45</sup> entdeckt und erstmals beschrieben. Es ist einzigartig für die Parasiten und ersetzt die Rolle des Glutathions und Thioredoxins in Säugetierzellen.<sup>46</sup> Trypanothion als zentraler Co-Faktor reduziert direkt Dehydroascorbat zu Ascorbinsäure, Glutathiondisulfid zu Glutathion,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Glutaredoxin, Thioredoxin und Ovothioliol-A-disulfid. Außerdem bindet es NO in einem unschädlichen Eisenkomplex und ist am Metabolismus von Xenobiotika unter katalytischer Wirkung einer Trypanothion-S-transferase beteiligt. Das Dithiol fördert die Entgiftung von Schwermetallen und Ketoaldehyden wie Methylglyoxal (Abbildung 1-12).

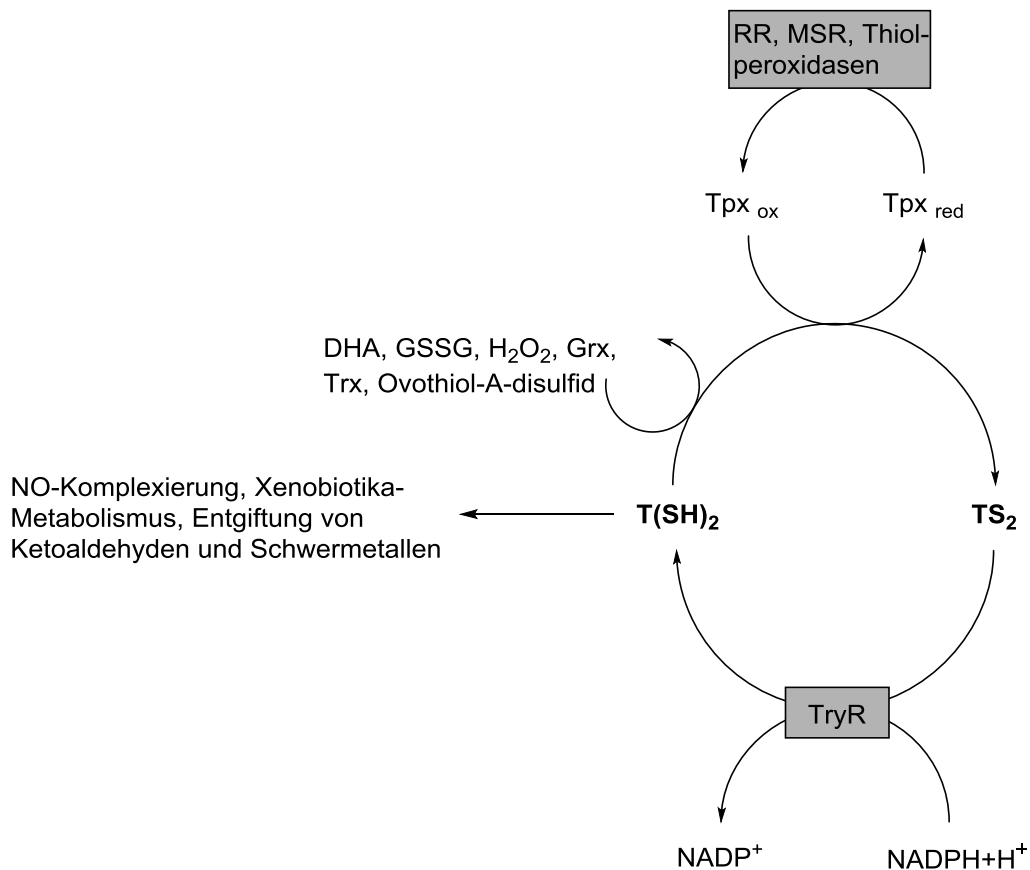


Abbildung 1-12: Der Trypanothionmetabolismus. DHA: Dehydroascorbinsäure; GSSG: Glutathiondisulfid; Grx: Glutaredoxin; Trx: Thioredoxin; RR: Ribonukleotidreduktase; MSR: Methioninsulfoxidreduktase; TryR: Trypanothionreduktase; Tpx: Tryparedoxin. Modifiziert nach KRAUTH-SIEGEL und LEROUX<sup>50</sup>, RADI *et al.*<sup>52</sup> und DIEDERICH und KRAUTH-SIEGEL<sup>51</sup>.

Über die direkte Reduktion von Tryparedoxin hat der Metabolit Trypanothion weiter indirekte Wirkung. So wird durch reduziertes Tryparedoxin der Aufbau von Desoxyribonukleotiden aus Ribonukleotiden, vermittelt durch die Ribonukleotidreduktase, ermöglicht.<sup>46–50</sup> Außerdem liefert das reduzierte Tryparedoxin Elektronen an verschiedene Thiolperoxidasen wie Peroxiredoxine oder Gpx-artige Peroxidasen, die für den Abbau von Peroxiden zuständig sind.<sup>51</sup> Die Methioninsulfoxidreduktase erhält die notwendigen Redoxäquivalente für die Biosynthese von Methionin ebenfalls von Tryparedoxin. Das Trypanothiondisulfid wird anschließend durch die TryR unter Verbrauch von NADPH wieder in das aktive Trypanothion überführt.<sup>46–50</sup>

Die Biosynthese der verschiedenen Vorstufen des Trypanothions erfolgt in den Trypanosomatiden auf unterschiedlichen Wegen (Abbildung 1-13).<sup>50, 53</sup> So kann Cystein, welches als Bestandteil des *gamma*-Glutamylcysteins benötigt wird, in *T. cruzi* und *Leishmania* spp. (*L. spp.*) aus Serin biosynthetisiert werden, wohingegen *T. brucei* keine geeigneten Enzyme für diesen Biosyntheseweg besitzt. Jedoch können alle drei Parasiten Cystein aus Homocystein durch reverse Transsulfuration gewinnen. Vor allem *T. brucei* nimmt extrazelluläres Cystein über Transporter auf. In allen drei betrachteten Parasiten (*T. brucei*, *T. cruzi*, *L. spp.*) kommt es unter Verbrauch von ATP zur Biosynthese von *gamma*-Glutamylcystein durch Ligation von Cystein an Glutaminsäure. Durch Verknüpfung von Glycin an *gamma*-Glutamylcystein wird Glutathion biosynthetisiert. An den zwei enzymatischen Schritten sind bei den drei betrachteten Parasiten identische Synthetasen beteiligt.<sup>49, 50, 52–54</sup>

Auch die Bereitstellung des Spermidins erfolgt auf unterschiedlichen metabolischen Wegen. *T. cruzi* verhält sich auxotroph in Bezug auf Polyamine und nimmt Transporter-gestützt die Vorstufe Putrescin oder direkt Spermidin aus dem umgebenden Medium auf. Die Biosynthese von Spermidin aus Putrescin läuft in allen drei Parasiten wieder identisch ab. Sie wird katalysiert durch die Spermidinsynthetase unter Verbrauch von S-Adenosylmethionin. *Leishmania*-Parasiten sind flexibler und besitzen mit der Arginase und Ornithindecarboxylase geeignete Enzyme, um Spermidin aus Arginin und Ornithin zu biosynthetisieren. *T. brucei* verfügt nicht über ausreichend Transporter in der Zellmembran und ist überwiegend auf die *de novo* Biosynthese von Spermidin angewiesen.<sup>50, 52–54</sup>

Die Biosynthese des Trypanothions findet unter Verbrauch von zwei Mol ATP ausgehend von zwei Mol Glutathion und einem Mol Spermidin statt. In einem ersten Reaktionsschritt wird Glutathion aktiviert und durch Ligation an Spermidin zum *N*<sup>1</sup>-Glutathionylspermidin oder auch zum *N*<sup>8</sup>-Glutathionylspermidin umgesetzt. In einem zweiten Reaktionsschritt wird aktiviertes Glutathion mit dem Glutathionylspermidin verknüpft und es entsteht das Dithiol

Trypanothion. Der erste Reaktionsschritt kann sowohl durch die Trypanothionsynthetase (TryS) als auch durch die Glutathionylspermidinsynthetase katalysiert werden.

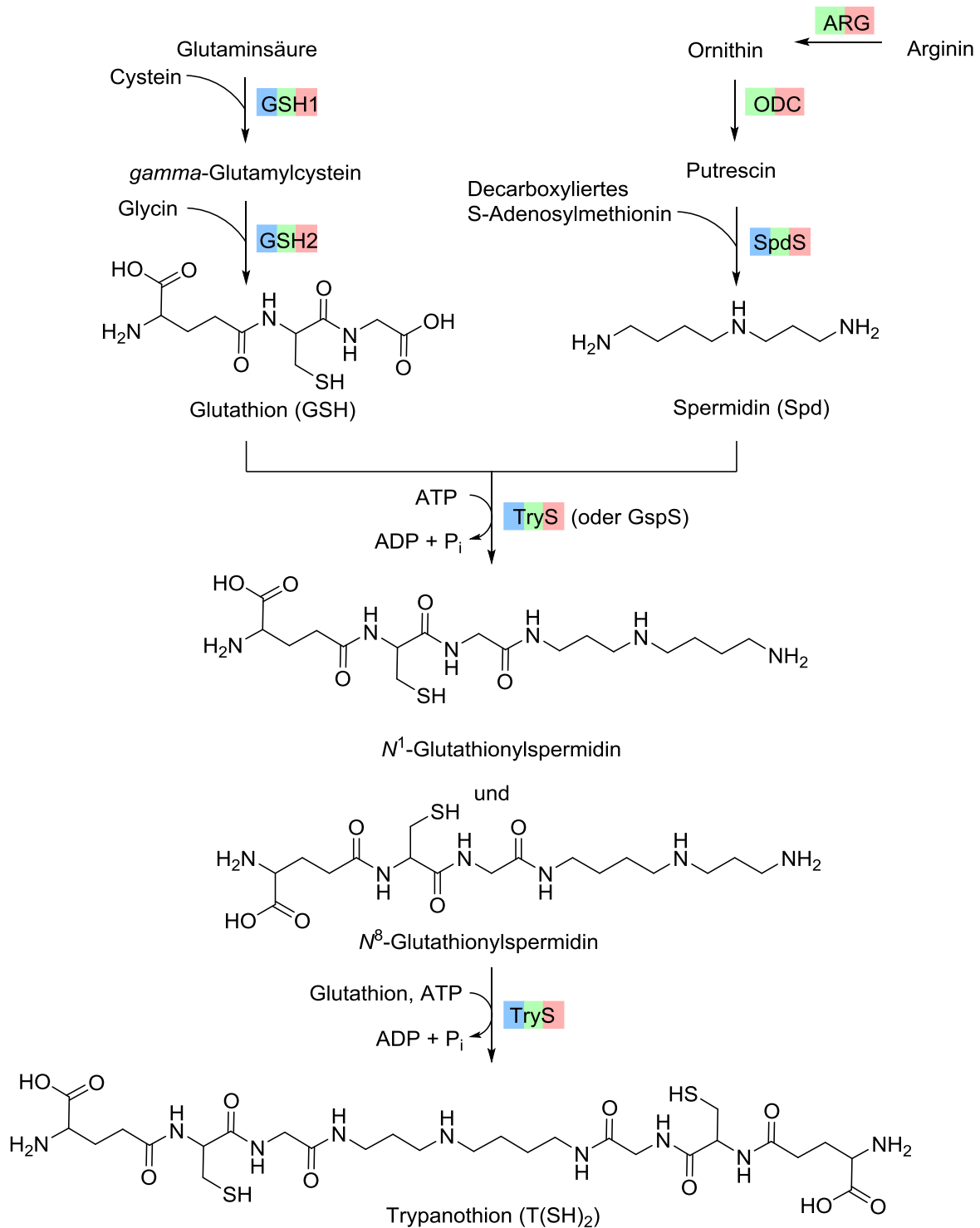


Abbildung 1-13: Biosynthese des Trypanothions. GSH1: *gamma*-Glutamylcysteinsynthetase; GSH2: Glutathionsynthetase; ARG: Arginase; ODC: Ornithindecaboxylase; SpdS: Spermidinsynthetase; TryS: Trypanothionsynthetase; GspS: Glutathionylspermidinsynthetase; Rot: *L. spp.*; Grün: *T. brucei*; Blau: *T. cruzi*. Modifiziert nach MANTA *et al.*<sup>53</sup> und LEROUX und KRAUTH-SIEGEL<sup>49</sup>.



Beide Enzyme besitzen sowohl eine Synthetase-Domäne (C-terminal) als auch eine Amidase-Domäne (N-terminal), das heißt, sie sind sowohl am Aufbau als auch am Abbau von Glutathionylspermidin beteiligt.<sup>46, 50, 55–57</sup> Allerdings verfügen nur *L. infantum*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *T. cruzi* und *Crithidia fasciculata* über die vollständige genetische Ausstattung zur Synthese der Glutathionylspermidinsynthetase.<sup>58</sup> Alle wichtigen humanpathogenen Trypanosomatiden sind hingegen in der Lage, die TryS zu exprimieren. Der zweite Reaktionsschritt hin zum Trypanothion wird bei den betrachteten Arten ausschließlich durch die TryS katalysiert.<sup>46, 50, 55–57</sup>

## 1.6 Die Trypanothionsynthetase

Neben der TryR stellt die TryS (Abbildung 1-14) als zentrales Enzym des Trypanothionmetabolismus ein attraktives *target* für die gezielte Inhibitorsynthese dar.<sup>59</sup> Sie wurde erstmals im Modellparasiten *Crithidia fasciculata* nachgewiesen.<sup>60, 61</sup> Da sie nicht im Säugetiermetabolismus vorkommt und auch keine weiteren Enzyme mit besonderer Homologie zur TryS im Säugetierwirt bekannt sind, kann man bei TryS-Inhibitoren eine günstige Selektivität erwarten.<sup>46</sup> Außerdem kommt die TryS nur in einer geringen Konzentration im Einzeller vor,<sup>62</sup> was wiederum eine geringe intrazelluläre Konzentration an Inhibitor erfordert.

Die TryS von *T. brucei* konnte bereits von COMINI *et al.*<sup>63</sup> als krankheitsrelevantes Zielmolekül genetisch mittels einer RNA-Interferenz-Methode identifiziert werden. Später wurde die *druggability* von TORRIE *et al.*<sup>64</sup> durch eine chemische Validierung der *TbTryS* bestätigt. Weiterhin wurde die *LTryS* als geeignetes Zielenzym sowohl genetisch als auch chemisch von SOUSA *et al.*<sup>58</sup> validiert. Eine genetische Untersuchung, die zeigt, dass die TryS für *T. cruzi* essentiell ist, steht noch aus. Inhibitoren der *TcTryS* zeigten in Experimenten jedoch potente antiproliferative Aktivität gegen *T. cruzi*-Amastigoten.<sup>65</sup> Nach FLOHÉ<sup>46</sup> ist die TryS der TryR als Zielenzym vorzuziehen. Erst ein Aktivitätsverlust der TryR von 95% und mehr führt zu einem gewünschten Einfluss auf den Redoxmetabolismus.<sup>66</sup> Folglich erwiesen sich Inhibitoren der TryR im Infektionsmodell nur als mäßig effizient.<sup>46</sup>

Auch die dreidimensionale Struktur der TryS konnte bereits für *L. major* in drei Kristallstrukturen dargestellt werden. Eine Cokristallisation mit Substraten des Enzyms war allerdings nicht möglich, sodass zum Vergleich die beschriebene *Escherichia coli*-Glutathionylspermidinsynthetase herangezogen werden musste. Es konnten zwei katalytische Domänen identifiziert werden, die der C-terminalen Synthetase-Domäne und der N-terminalen Amidase-Domäne zugeordnet werden konnten. Zusammengenommen

katalysiert das Enzym vier Reaktionsschritte. Die C-terminale Domäne ermöglicht die Ligation von Glutathion zunächst an Spermidin und dann an Glutathionylspermidin, wohingegen die N-terminale Domäne die Hydrolyse von Trypanothion und dann von Glutathionylspermidin katalysiert.<sup>59</sup>

Von COMINI<sup>62</sup> wurden drei mögliche mechanistische Abläufe zur Biosynthese des Trypanothions postuliert: Es gibt zwei unterschiedliche Reaktionszentren, die sowohl die  $N^1$ -, als auch die  $N^8$ -Position des Spermidins bedienen und eine Ligation von Glutathion ermöglichen. Das Reaktionszentrum ist sehr flexibel und in der Lage, beide Positionen im Spermidin mit Glutathion zu bedienen. Als dritte Möglichkeit wurde in Betracht gezogen, dass nur ein Reaktionszentrum existiert und das Glutathionylspermidin den Bindungsmodus so ändert, dass auch die zweite Aminogruppe zur Ligation angeboten werden kann. Durch die Arbeit von FYFE *et al.*<sup>59</sup> konnten drei Bindetaschen (S1–S3) lokalisiert werden. Die S1-Region ist eine charakteristische ATP-Bindetasche. Es gibt einen hydrophoben Bindespalt für den Adenin-Rest des ATPs, während die Phosphatgruppen durch einen hydrophilen Kanal und zwei Magnesiumionen in Position gehalten werden. Zudem wurde eine gut strukturierte S2-Bindetasche für Glutathion und eine weniger strukturierte S3-Bindetasche für Spermidin gefunden. Die trianguläre Anordnung dieser drei Taschen lässt darauf schließen, dass nur ein Reaktionszentrum existiert. So stellte FYFE *et al.*<sup>59</sup> eine abgeänderte Hypothese zum mechanistischen Ablauf auf. Zunächst werden alle drei Bindetaschen besetzt. Ein Phosphatrest von ATP wird auf Glutathion übertragen und das Intermediat wird durch die Magnesiumionen und Intermediat-Enzym-Wechselwirkungen stabilisiert. Es kommt zu einem nukleophilen Angriff des Spermidins am aktivierten Glutathion und  $N^1$ -Glutathionylspermidin wird gebildet. In einem zweiten Reaktionsschritt verlassen alle resultierenden Produkte die Bindetaschen und die S1- und S2-Bindetaschen werden neu besetzt. Glutathionylspermidin bindet nun in der S3-Bindetasche, wobei der Peptid-Anteil dem Reaktionszentrum entgegen gerichtet ist. Das  $N^1$ -Glutathionylspermidin kann erneut mit dem terminalen Amin an einem aktivierten Glutathion angreifen, sodass das Trypanothion aus der Reaktion resultiert.<sup>59</sup>

Durch *molecular dynamics simulation* und *docking* wurde eine weitere mögliche Binderegion an der Synthetase-Domäne aufgedeckt. So soll nach KOCH *et al.*<sup>67</sup> diese S4-Bindetasche an der Trypanothionbiosynthese wie folgt beteiligt sein: Nachdem der erste Reaktionsschritt wie oben beschrieben abgelaufen ist, verlässt das gebildete Glutathionylspermidin die S2- und S3-Bindetasche und bindet anschließend invers in die S3- und S4-Bindetasche. Die S1-Tasche wird mit neuem ATP und die S2-Tasche mit neuem GSH besetzt, worauf die Reaktion zum Trypanothion analog zur Bildung des Glutathionylspermidins erfolgt. Durch die Arbeit von Koch *et al.*<sup>67</sup> konnten flexible *loop*-Regionen in der TryS modelliert werden, die nicht in der Kristallstruktur von *L. major* sichtbar, aber von Bedeutung für den

mechanistischen Ablauf der Trypanothionbiosynthese sind. So konnten verschiedene spezifischere Modelle der TryS entworfen werden.<sup>67</sup>

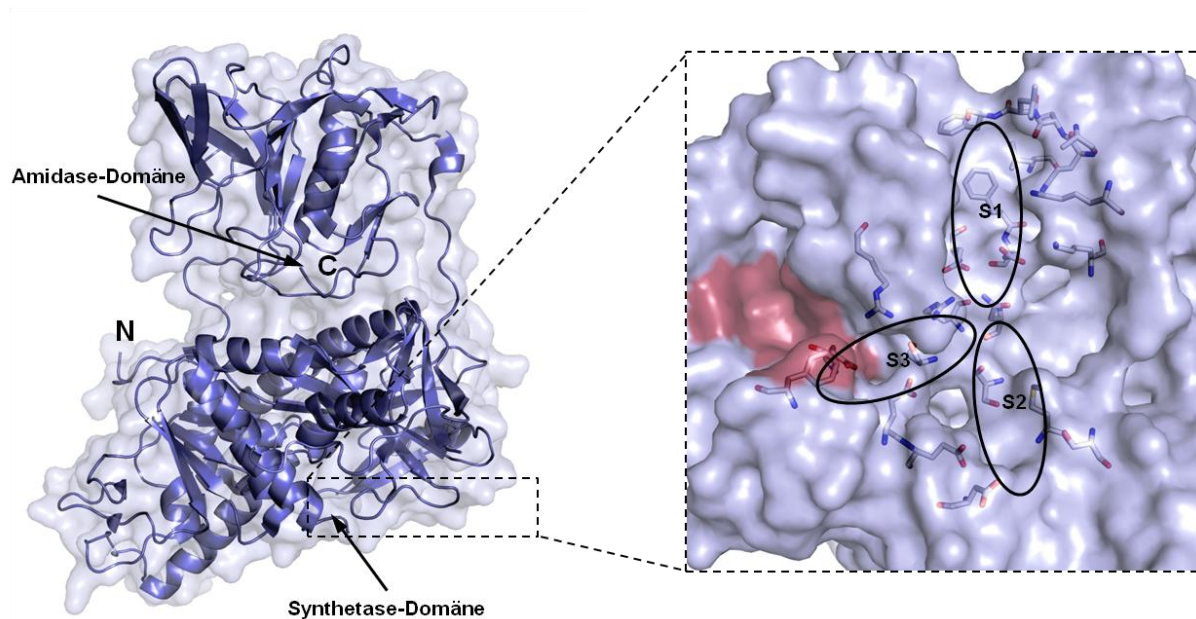


Abbildung 1-14: Kristallstruktur 2VPS der *L. major*-TryS mit Amidase-Domäne und Synthetase-Domäne. **C**: C-Terminal; **N**: N-Terminal. *rechts*: Vergrößerung der Synthetase-Domäne mit triangulärer Anordnung der Bindetaschen S1-S3, dargestellt als Ellipsen. Hervorgehoben in Rot ist der Bereich einer möglichen S4-Bindetasche nach *molecular dynamics simulation* und *docking* von KOCH *et al.*<sup>67</sup> Grafiken modifiziert nach FYFE *et al.*<sup>59</sup>

### 1.6.1 Die Trypanothionsynthetase als Zielenzym

Da sich die TryS als vielversprechendes Zielenzym für mögliche Arzneistoffe zur Bekämpfung von Trypanosomatiden herauskristallisiert hat, wurden bereits einige Kampagnen zum Auffinden und Entwickeln von gezielten Hemmstoffen des Enzyms durchgeführt. Literaturbekannte aktive Verbindungen sind in Abbildung 1-15 dargestellt. So lieferte das Screening einer Substanzenbibliothek von 62000 Verbindungen gegen die *TbTryS* verschiedene aktive Verbindungen, die nach Clusterbildung sukzessiv optimiert wurden. Neben Phenylthiazolen und Phenyltetrazolen konnten Phenylindazole wie DDD86243 (**23**) und DDD85811 (**24**) synthetisiert werden, die die *TbTryS* im nanomolaren Bereich mit einem IC<sub>50</sub> für **23** von 0.14 µM und für **24** von 0.095 µM inhibieren. Antiparasitäre Wirkung gegen *T. brucei* im submikromolaren Bereich konnte allerdings nicht beobachtet werden.<sup>68</sup> Mit Hilfe von Verbindungen, die aus dieser Strukturoptimierung hervorgingen, wurde die *TbTryS* als Zielenzym chemisch validiert.<sup>64</sup> Unter Zuhilfenahme von computerchemischen Methoden konnten Oxabicyclo[3.3.1]nonanone als Inhibitoren der

*L. donovani*-TryR und -TryS identifiziert werden. Ein Vertreter der neuen Substanzklasse ist PS203 (**25**) mit einem  $K_i$  von 14.2  $\mu\text{M}$  gegenüber der Synthetase und antiparasitärer Aktivität im einstellig mikromolaren Bereich ( $\text{IC}_{50}$  von 4.9  $\mu\text{M}$ ) gegenüber *L. donovani*-Promastigoten. Diese Substanz kann als Ausgangsverbindung für eine Strukturoptimierung dienen.<sup>69</sup> Als potenter Inhibitor der *Crithidia fasciculata*-Glutathionylspermidinsynthetase zeigt das Phosphinat **26** auch Aktivität gegenüber der *LmTryS* mit einem  $\text{IC}_{50}$  von 0.65  $\mu\text{M}$  und der *TcTryS* mit einem  $\text{IC}_{50}$  von 0.53  $\mu\text{M}$ .<sup>70</sup> Zudem wurden verschiedene Naturstoffe gegen die TryS von *L. donovani* erfolgreich getestet. Verbindungen wie Tomatin, Ouvaol und Betulin zeigten sich als Inhibitoren mit einem  $K_i$  im einstellig oder niedrig zweistellig mikromolaren Bereich, wobei das Steroid-Alkaloid Conessin (**27**) den potentesten Inhibitor aus diesem Screening mit einem  $K_i$  von 3.12  $\mu\text{M}$  darstellt. Die aktiven Verbindungen wurden auf antiparasitäre Aktivität gegen Promastigoten des Parasiten untersucht, wobei sich  $\text{EC}_{50}$ -Werte im niedrig zweistellig mikromolaren Bereich ergaben.<sup>71</sup>

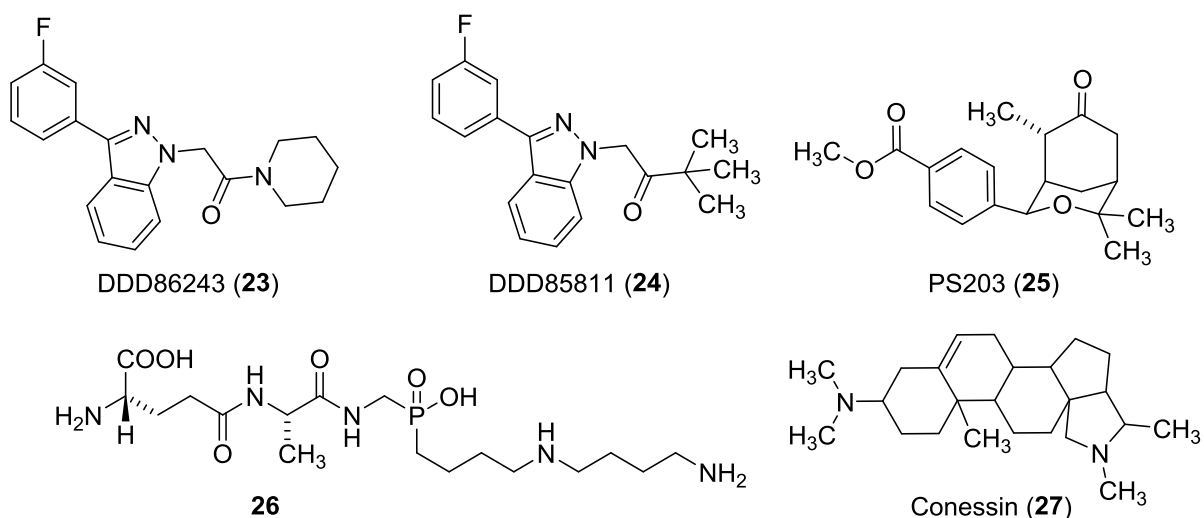


Abbildung 1-15: Literaturbekannte Inhibitoren der TryS.

### 1.6.2 Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase

Die derzeit potentesten Inhibitoren der *L*TryS sind Vertreter der 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one (Abbildung 1-16). Die Substanzklasse wird auch als Paullone bezeichnet und wurde von KUNICK 1992 erstmals beschrieben.<sup>72</sup> Paullone sind dafür bekannt, die Proteinkinasen CDK1, CDK2 und GSK-3 zu inhibieren und zeichnen sich durch antineoplastische Wirkung aus.<sup>73, 74</sup> Durch eine Substitution am Lactamstickstoff *N*<sup>5</sup> verlieren sie jedoch ihre kinaseinhibitorische Wirkung.<sup>75</sup>

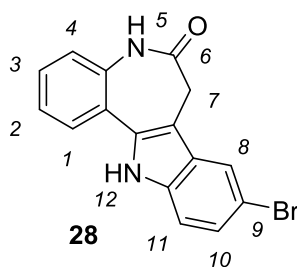


Abbildung 1-16: Das Kenpaullon (**28**). Die Verbindung ist ein typischer Vertreter der 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one und stellt einen CDK/GSK-3-Inhibitor dar.<sup>76</sup>

In einem Screening von ATP-Analoga gegen die TryS von *Crithidia fasciculata* erwiesen sich *N*<sup>5</sup>-substituierte Paullone als potente Inhibitoren der TryS im niedrig nanomolaren Bereich.<sup>77</sup> In einer entsprechenden Patentanmeldung wurde das *N*<sup>5</sup>-substituierte Kenpaullon **29** publiziert (Abbildung 1-17), welches bei 10  $\mu$ M die *Cf*TryS zu 92.4% inhibiert.<sup>78</sup> Paullone besetzen die ATP-Bindetasche der TryS, wobei sie durch zwei Proteinschleifen in Position gehalten werden.<sup>77</sup> Gegen die TryS pathogener Spezies zeigen die synthetisierten *N*<sup>5</sup>-substituierte Paullone allerdings deutlich schwächere Aktivität, was mit der räumlichen Veränderung eines Spalts außerhalb der aktiven Bindetasche begründet wird, der jedoch relevant für das Binden des *N*<sup>5</sup>-Substituenten ist.<sup>79</sup> Neueren Erkenntnissen zufolge verhalten sich *N*<sup>5</sup>-substituierte Paullone auch kompetitiv gegenüber Spermidin.<sup>80</sup> Mit FS-554 (**30**, Abbildung 1-17) wurde ein Paullon beschrieben, das die *L*TryS mit einem IC<sub>50</sub> von 350 nM inhibiert. In Experimenten mit *L. infantum*-Promastigoten zeigte sich die Substanz weniger potent mit einem EC<sub>50</sub> von 112  $\mu$ M. Dennoch konnte mit FS-554 die *L*TryS als krankheitsrelevantes Zielenzym validiert werden.<sup>58</sup> In einem von BENÍTEZ *et al.* durchgeführten Screening konnte die Verbindung MOL2008 (**31**, Abbildung 1-17) als weiteres *N*<sup>5</sup>-substituiertes Paullon identifiziert werden, das potent mit einem IC<sub>50</sub> von 0.15  $\mu$ M die *L*TryS hemmt.<sup>80</sup> MOL2008 war bereits als nanomolarer Inhibitor der *Cf*TryS aus früheren Untersuchungen bekannt.<sup>77, 81</sup> Im Vergleich zu FS-554 (**30**) erwies sich MOL2008 als aktiver Inhibitor von *L. infantum*-Promastigoten mit einem EC<sub>50</sub> von 13  $\mu$ M. Zudem wurde

nachgewiesen, dass MOL2008 auch *in vivo* die Trypanothionbiosynthese inhibiert. Mit einem Selektivitätsindex von 2.4 ist die Verbindung jedoch wenig selektiv gegenüber murinen Makrophagen.<sup>80</sup>

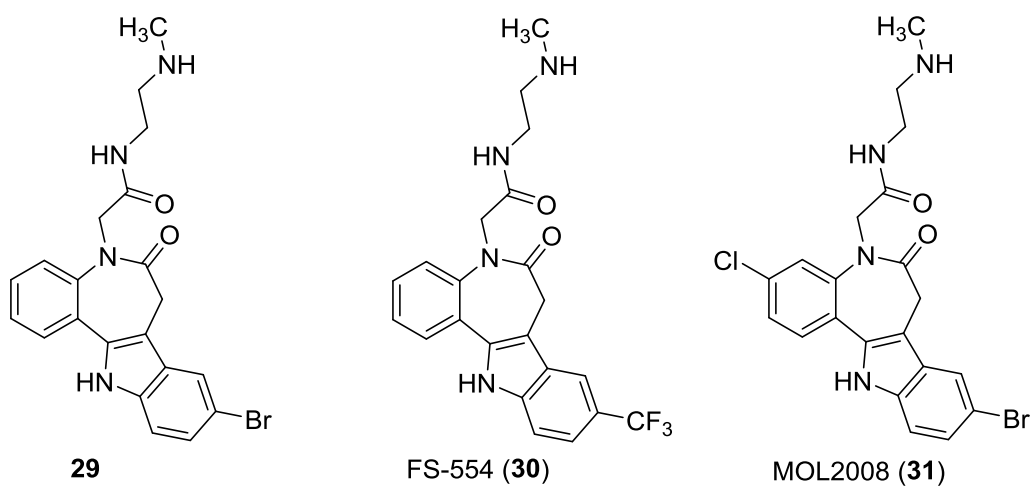


Abbildung 1-17: Literaturbekannte *N*<sup>6</sup>-substituierte Paullone mit Hemmwirkung auf die TryS.

## 2. Zielsetzung

Durch eine vorangegangene Arbeit von KORN konnten bereits verschiedene  $N^5$ -substituierte Paullone beschrieben werden, die gegenüber *TbTryS* schwache und gegenüber *LtTryS* starke Hemmaktivität zeigten. Zudem hemmten einige Paullone das Wachstum des Modellparasiten *T. brucei brucei*. In Hinblick auf die biologische Aktivität hat sich dabei das 3-Chlorkenpaullon (**32**) als vorteilhafter Grundkörper erwiesen.<sup>82</sup> Besonders aktive Verbindungen und das 3-Chlorkenpaullon (**32**) sind in Abbildung 2-1 dargestellt.

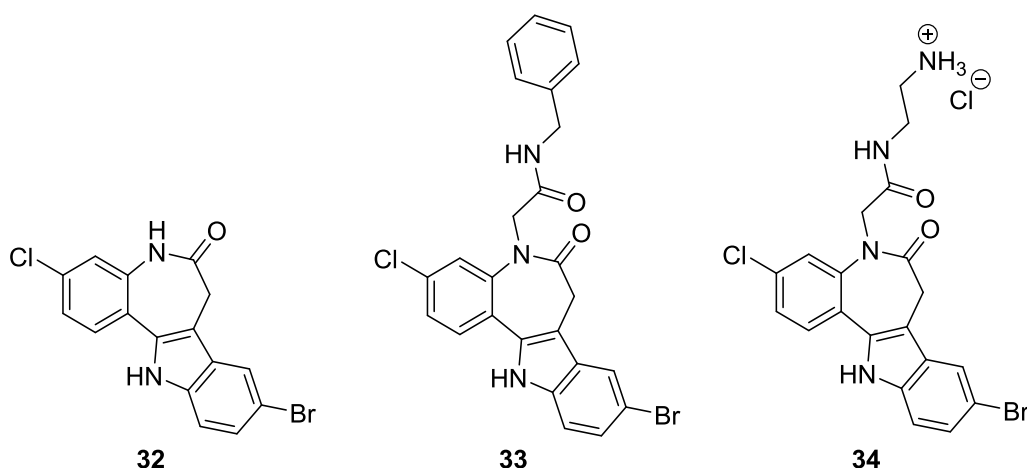


Abbildung 2-1: 3-Chlorkenpaullon (**32**) und  $N^5$ -substituierte 3-Chlorkenpaullone **33** und **34**. Verbindung **33**:  $EC_{50}$  *T. brucei brucei*-Parasiten 40 nM und Inhibition der *TbTryS* bei 30  $\mu$ M 45.2%; Verbindung **34**:  $IC_{50}$  *LtTryS* 0.27  $\mu$ M.<sup>82</sup>

Unter Beibehaltung des 3-Chlorkenpaullon-Grundkörpers sollte zunächst das Paullon- $N^5$ -acetamid **33**<sup>82</sup> für Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen modifiziert werden. Dazu wurde angestrebt, am Benzylring verschiedene Substituenten einzuführen oder diesen durch Pyridin-Substituenten zu ersetzen (Abbildung 2-2). Neben Untersuchungen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gegenüber *T. brucei brucei*-Parasiten sollte vorzugsweise die Inhibition der *TbTryS* optimiert werden.

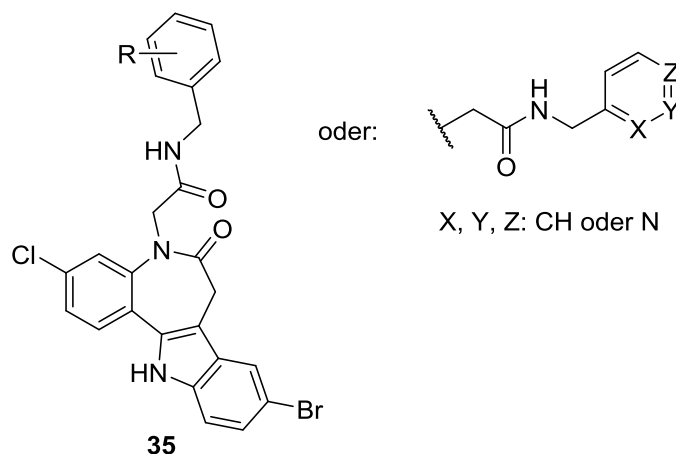


Abbildung 2-2: Zielverbindungen **35**. Strukturvariationen am Benzylring des Paullon- $N^5$ -acetamids **33** sollten zu den Verbindungen **35** führen.

Weiterführend sollten verschiedene 3-Chlorkenpaullone mit unterschiedlichem Substitutionsmuster am Lactamstickstoff  $N^5$  synthetisiert werden, um Struktur-Aktivitätsbeziehungen in Bezug auf eine Inhibition der TryS zu untersuchen. Ein präparativer Schwerpunkt wurde auf die Darstellung von  $N^5$ -Acetamiden mit basischem Zentrum in der Seitenkette gelegt. Im Vorfeld von KORN durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass Verbindungen mit basischem Stickstoff in der  $N^5$ -Seitenkette, wie die Verbindung **34**, gute Aktivität an der *L*TryS aufwiesen.<sup>82</sup> Die Feststellung kann durch Angaben aus der Literatur bestätigt werden. Sie zeigen, dass  $N^5$ -substituierte Paullone mit basischem Amin in der Seitenkette die TryS verschiedener Vertreter der Familie *Trypanosomatidae* hemmen.<sup>58, 78, 80</sup> Zudem sollte in einem Teilprojekt die gezielte Substitution am Indolstickstoff  $N^{12}$  näher untersucht werden. Außerdem wurden Versuche zur selektiven Reduktion am substituierten und unsubstituierten 3-Chlorkenpaullon angestrebt (Abbildung 2-3).



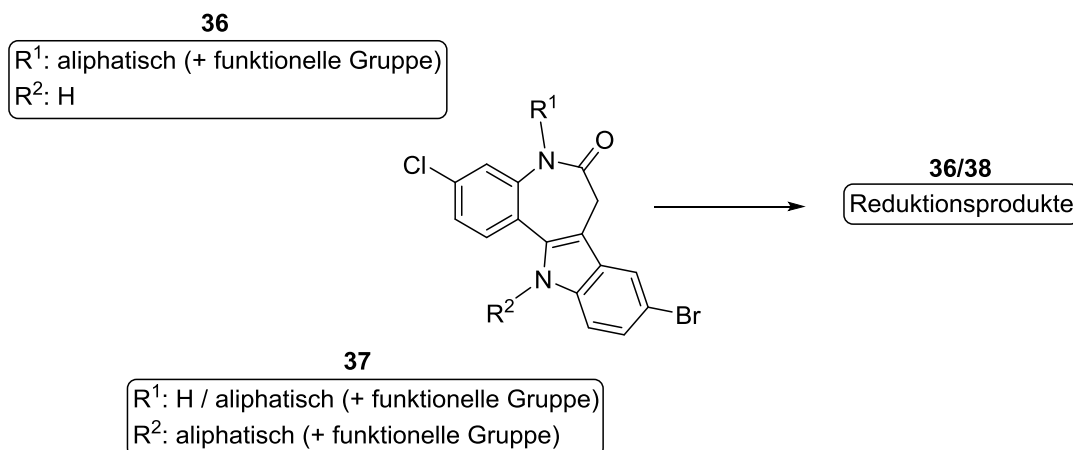


Abbildung 2-3: Substitutionen und reduktive Modifikationen an Verbindungen mit 3-Chlorkenpaullon-Grundkörper. Das Einführen verschiedener Reste am Lactamstickstoff  $N^6$  sollte zu den Verbindungen **36** führen. Schwerpunktmäßig wurden Paullon- $N^6$ -acetamide mit basischer Seitenkette synthetisiert. Zudem sollten  $N^{12}$ -substituierte Paullone (Verbindungen **37**) präparativ dargestellt und substituierte und unsubstituierte Paullone reduziert werden (Verbindungen **36** und **38**).

Die Auswahl geeigneter Substituenten sollte auf Grundlage von *docking*-Studien erfolgen. Für das *docking* konnten Homologiemodelle der TryS von *L. infantum*, *T. brucei* und *T. cruzi* verwendet werden. Auch Ergebnisse aus biologischen und biochemischen Testungen sollten durch *docking* untermauert werden. Die Wahl der Substituenten sollte sich außerdem löslichkeitsverbessernd auf die Zielverbindungen auswirken. Die Löslichkeit ausgewählter Testverbindungen in wässrigen Medien sollte mit geeigneten Verfahren untersucht werden. Die biologische und biochemische Evaluierung der Verbindungen sollte im Rahmen eines COST-Projektes erfolgen und die Arbeit ergänzen. Die Evaluierung wurde in der Arbeitsgruppe von COMINI (Marcelo A. Comini, Laboratory Redox Biology of Trypanosomes, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay) durchgeführt. Die Testung war an *T. brucei brucei*-Blutstrom-Trypomastigoten und an *L. infantum*-Promastigoten vorgesehen. Für die biochemische Evaluierung sollten für alle Verbindungen die *tri-tryp*-TryS verwendet werden. Die Zytotoxizität wurde an murinen Makrophagen ermittelt. Aus Experimenten von KORN<sup>83</sup> und aus ersten Ergebnissen der biologischen und biochemischen Evaluierung der Derivate **35** wurde ersichtlich, dass einige  $N^6$ -substituierte Paullone, neben der TryS, weitere Zielstrukturen in *T. brucei brucei* bedienen. Folglich sollte Verbindung **33** durch Anbringen von Seitenketten mit reaktiven funktionellen Gruppen für eine Bindung an feste Trägermaterialien zugänglich gemacht werden. Durch Affinitätsuntersuchungen mit diesen Matrices sollten dann weitere Zielproteine identifiziert werden, die Affinität zu den antiparasitär wirkenden Paullonen besitzen.

### 3. Untersuchungen zu Protein-Liganden-Wechselwirkungen

Bei der Entwicklung von Wirkstoffen hat das computergestützte strukturbasierte Wirkstoffdesign einen festen Platz eingenommen. Ziel des Verfahrens ist es, zu einem bekannten Zielprotein einen passenden Liganden unter Verwendung von computerchemischen Methoden zu identifizieren. Dieser wird anschließend sukzessiv optimiert.<sup>84</sup> Der Ligand sollte sich nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip in die dreidimensionale Bindetasche des Proteins einpassen<sup>85</sup> und somit eine hohe Affinität zum Protein besitzen. Für computergestützte Methoden stehen eine Vielzahl von Proteinstrukturen aus der öffentlichen zugänglichen PDB (*protein data bank*)<sup>86</sup> zur Verfügung. Bei dem angestrebten Protein-Liganden-*docking* werden unterschiedliche Konformationen und Orientierungen desselben Liganden bei einem gegebenen Zielprotein erzeugt und in eine Binderegion eingepasst. Die erzeugten Posen werden anschließend in einem *scoring* bewertet<sup>87</sup> und liefern Hinweise zu möglichen Protein-Liganden-Wechselwirkungen.

Mit der Veröffentlichung des *docking*-Programms DOCK durch KUNTZ *et al.* 1982 war es erstmals möglich, Liganden in Bindetaschen zu modellieren, damals noch unter Verwendung eines starren Liganden und einer starren Proteinbindetasche.<sup>88, 89</sup> Seitdem wurden diverse *docking*-Programme entwickelt und optimiert. So zeigt eine Untersuchung von 2013,<sup>90</sup> dass zwischen 2010 und 2011 neben AutoDock und Glide vor allem GOLD angewendet wurde. Bei dem verwendeten Programm GOLD (*genetic optimisation for ligand docking*)<sup>91</sup> werden ein flexibler Ligand und ein zumindest partiell flexibles Protein eingesetzt. Alle *docking*-Programme haben gemeinsam, dass die Posenauswahl einem Algorithmus folgt. Im Fall von GOLD ist dies ein genetischer Algorithmus, der auf der Darwinschen Evolutionstheorie beruht. Bei diesem genetischen Algorithmus kommt es zu einer Änderung der Daten, die eine mögliche Lösung für einen Protein-Liganden-Komplex codieren und als Chromosomen bezeichnet werden. Die Änderung der zunächst zufällig erzeugten Daten erfolgt durch die Operatoren Crossover, Mutation und Migration. Chromosomen und Operatoren werden dabei ebenfalls zufällig gewählt. Nach einer Bewertung der ermittelten Posen werden die besten Posen für den nächsten Veränderungszyklus eingesetzt.<sup>85, 91, 92</sup> Für die abschließende Analyse der gebildeten Bindungsposen findet bei dem nachfolgend beschriebenen Protein-Liganden-*docking* mit GOLD die *scoring*-Funktion *ChemPLP* Verwendung. Bei *ChemPLP* werden teilweise Terme von älteren *scoring*-Funktionen verwendet. So werden Energieterme der *scoring*-Funktion *ChemScore* berücksichtigt, die sowohl die Ligandenenergie definieren als auch die Wasserstoffbrücken und Metallionen-Bindungen winkelabhängig abschätzen. Außerdem hat bei *ChemPLP* das sterische Ineinanderpassen

von Ligand und Molekül Einfluss auf die Bewertung der Pose. Hierfür wurde eine *piecewise linear potential* (PLP) *scoring*-Funktion entwickelt. Dabei gibt es einen rein repulsiven Teil für abstoßende Kontakte wie Donor-Donor-, Akzeptor-Akzeptor- und Metall-Donor-Kontakte. Alle weiteren Interaktionen werden durch eine zweite Funktion beschrieben, in die sowohl anziehende als auch repulsive Interaktionen eingehen.<sup>93, 94</sup> Untersuchungen von LIEBESCHUETZ, COLE und KORB zeigen, dass durch *ChemPLP* besonders gute Ergebnisse in der Posen-Vorhersage beim *docking* erzielt werden.<sup>94</sup>

### 3.1 *docking*-Untersuchung substituierter Paullone

Zur Vorbereitung der *docking*-Untersuchung der substituierten Paullone wurden die Verbindungen zunächst mit MOE (*molecular operating environment*)<sup>95</sup> dargestellt. Funktionelle Gruppen, die bei physiologischem pH-Wert überwiegend positiv geladen vorliegen, wurden protoniert. Anschließend wurde der Ligand energieminiert und für das *docking* mit GOLD eingesetzt. Als Zielproteine wurden Modelle der TryS von *L. infantum*, *T. brucei* und *T. cruzi* verwendet (Abbildung 3-1), da nur die Kristallstrukturen der TryS von *L. major* bekannt sind (PDB: 2VOB, 2VPM, 2VPS).<sup>59</sup> Die Modelle wurden von KOCH (Oliver Koch, TU Dortmund) erstellt und für computerchemische Experimente überlassen. Da aus der Literatur bereits bekannt ist, dass *N*<sup>5</sup>-substituierte Paullone vor allem die TryS von *L. infantum* inhibieren,<sup>58, 80</sup> wurde ein Schwerpunkt bei den Untersuchungen auf dieses Zielenzym gelegt. Die verwendeten Modelle enthalten dabei weder Wassermoleküle noch Magnesiumionen, die an der Koordination der beteiligten Biosynthesedukte und Zwischenprodukte beteiligt sind.<sup>67</sup> Die verschiedenen Paullone wurden in die ATP-Bindetasche der Enzyme gedockt. Das *docking* erfolgte dabei unter der Verwendung des *chemscore kinase*-Templates, einem Template, das speziell für das *docking* mit Kinasen konzipiert wurde. Dies schien sinnvoll, da sowohl bei der Kinase als auch bei der TryS Phosphatreste von ATP übertragen werden. Zudem ist der ATP-Bindespalt der TryS dem einer Kinase strukturell ähnlich.<sup>96</sup> Die Bewertung der erhaltenen Ligandenposen wurde anhand visueller Kriterien durchgeführt. Die Posenselektion erfolgte hierbei unter Berücksichtigung von Informationen aus der Literatur, die Anhaltspunkte über den Bindemodus von *N*<sup>5</sup>-substituierten Paullonen in der TryS liefern.

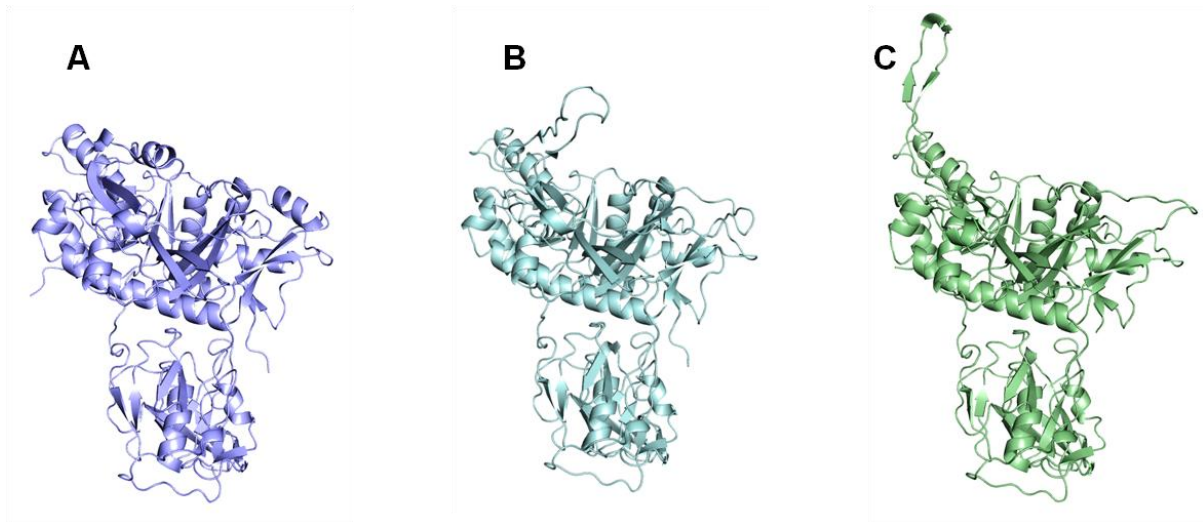


Abbildung 3-1: Modelle verschiedener Trypanothionsynthetasen für das Protein-Liganden-docking. *LiTryS* (A, blau), *TcTryS* (B, cyan), *TbTryS* (C, grün).

Bei näherer Betrachtung des ATP-Bindespalt zeigen sich strukturelle Unterschiede in den Modellen der *LiTryS*, *TcTryS* und *TbTryS* (Abbildung 3-2), auf die bereits in der Literatur hingewiesen wird.<sup>79</sup> So schließt sich der Aminosäure PHE586 (*LiTryS*), PHE574 (*TcTryS*) und PHE580 (*TbTryS*) ein Kanal an, der sich bereits außerhalb der ATP-Bindetasche befindet. Die Öffnung dieses Kanals ist bei dem Modell der *TbTryS* und *TcTryS* verengt und bietet für eine Protein-Liganden-Interaktion nur bedingt Raum. Das Modell der *LiTryS* beinhaltet hingegen einen Kanal, der weniger sterische Hinderung bietet, sodass in diesem Bereich auch voluminösere Substituenten eines Liganden binden könnten. Diese strukturelle Besonderheit kann eine Selektivität der *N*<sup>5</sup>-substituierten Paullone für die Hemmung der *LiTryS* erklären. Auch dieser Ansatzpunkt wurde bereits in der Literatur beschrieben.<sup>79</sup>

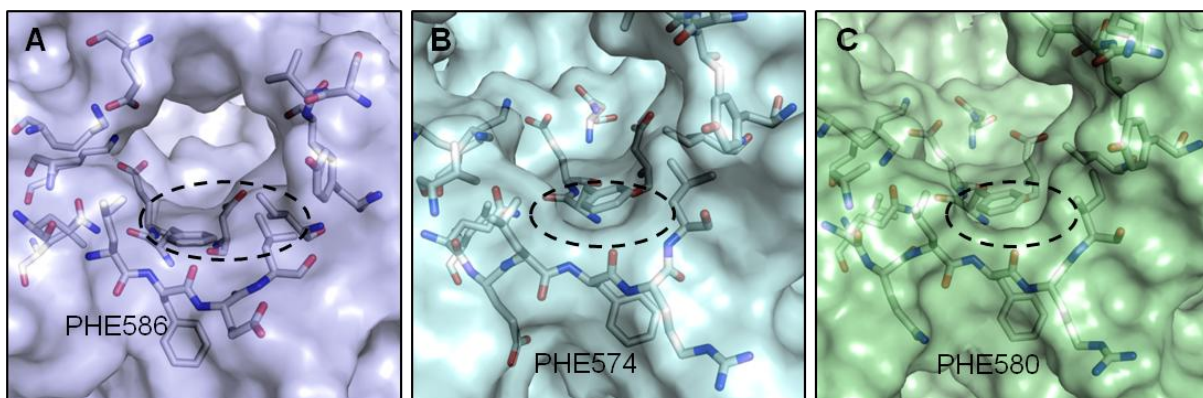


Abbildung 3-2: Vergleich der TryS-Modelle. ATP-Bindungsspalt der *LiTryS* (A, blau), *TcTryS* (B, cyan) und *TbTryS* (C, grün). Die Öffnungen eines möglichen Bindungskanals sind durch unterbrochene Ellipsen gekennzeichnet.

### 3.1.1 Bindungsmodus der substituierten Paullone abgeleitet von der Kristallstruktur der GSK-3 im Komplex mit Alsterpaullon

Zur Selektion potentieller Bindungsposen wurden die computerchemischen Überlegungen von KOCH zum Bindungsmodus  $N^{\bar{5}}$ -substituierter Paullone in der TryS, veröffentlicht in der Publikation von ORBAN *et al.*,<sup>96</sup> mit einbezogen. Grundlage der von KOCH dargelegten Idee ist, dass sich die ATP-Binderegion der TryS und die ATP-Bindetasche der Proteinkinasen hinsichtlich räumlicher Struktur und Funktion gleichen. Folglich ist auch anzunehmen, dass Paullone die TryS und die Proteinkinasen auf ähnliche Weise inhibieren. Dazu wurde zunächst ein Bindungsmodus des Paullons **36d** generiert, der dem Modus des Alsterpaullons (**39**) in der Proteinkinase GSK-3 sehr ähnlich ist. Hierfür wurde die Kristallstruktur der GSK-3 im Komplex mit Alsterpaullon (**39**) (PDB: 1Q3W) als Matrize verwendet. Anschließend wurde das Paullon **36d** unter Festlegung zweier *constraints* in Form von Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und PHE586 in das Modell der *L*TryS gedockt, wobei der von KOCH präferierte Bindemodus resultierte. Die so erzeugte Konformation von **36d** im ATP-Bindespalt des Modells der *L*TryS ist der Konformation des Alsterpaullons in der ATP-Bindetasche der GSK-3 sehr ähnlich, was durch die Überlagerung der Cokristallstruktur der GSK-3 mit dem Modell der *L*TryS in Abbildung 3-3 verdeutlicht wird. Zudem liefert die Abbildung eine mögliche Erklärung, warum  $N^{\bar{5}}$ -substituierte Paullone selektiv die TryS inhibieren und nicht Proteinkinasen hemmen. So wird durch den Substituenten am Lactamstickstoff  $N^{\bar{5}}$  die Aminosäureoberfläche der Proteinkinase an TYR134, an der sogenannten *hinge*-Region, geschnitten. Aus sterischen Gründen wäre somit die Inhibition der GSK-3 durch  $N^{\bar{5}}$ -substituierte Paullone unterbunden. Außerdem verhindert die Substitution am  $N^{\bar{5}}$  die Ausbildung mindestens einer der beiden Wasserstoffbrücken zwischen der Lactam-Partialstruktur des Paullons und VAL135. Auch auf diese Annahme wird durch KOCH in der Publikation von ORBAN *et al.*<sup>96</sup> hingewiesen. Das Paullon- $N^{\bar{5}}$ -acetamid **36d** wurde für die Darstellungen gewählt, da es die Ausgangsstruktur für viele später beschriebene Derivatisierungen repräsentiert.

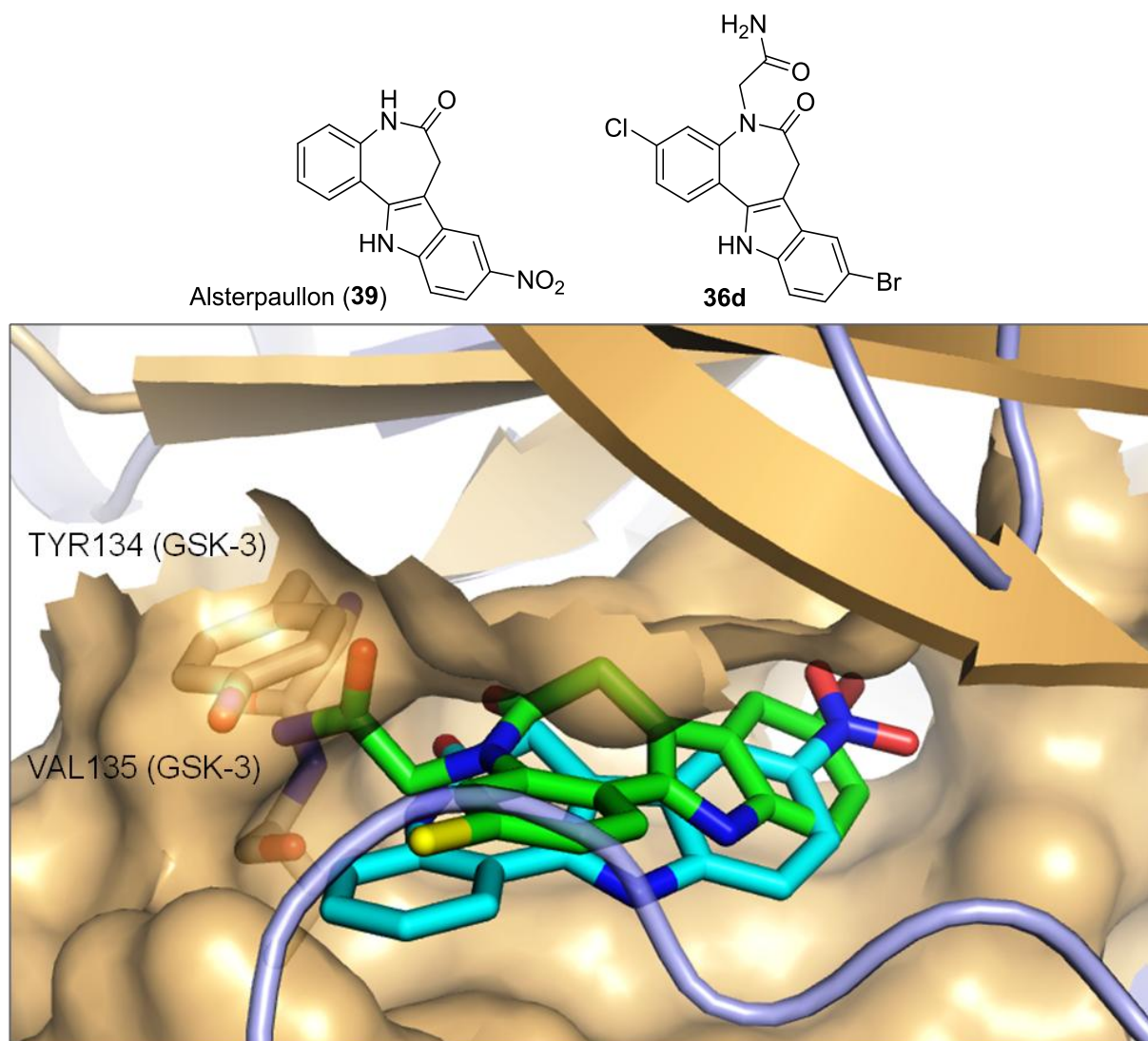


Abbildung 3-3: Herleitung eines Bindungsmodus. Das Modell der *LiTryS* (blauer *cartoon*) mit gedocktem Paullon-*N*<sup>5</sup>-acetamid (**36d**, grün) und die Cokristallstruktur (PDB: 1Q3W) bestehend aus GSK-3 (orange Oberfläche, oranger *cartoon*) und Alsterpaullon (**39**, türkis) wurden überlagert. Der *N*<sup>5</sup>-Substituent des Paullon-*N*<sup>5</sup>-acetamids würde bei gleicher Konformation in der GSK-3 die Oberfläche der GSK-3 bei TYR134 durchstoßen und eine Wasserstoffbrückenbildung zu VAL135 unterbinden.

Betrachtet man die Bindungspose der Verbindung **36d** in der ATP-Bindetasche der *LiTryS* im Detail (Abbildung 3-4), so werden wichtige Liganden-Protein-Wechselwirkungen deutlich, die die erstellte Pose stützen. Die voluminöse Indol-Partialstruktur des Paullons füllt die ATP-Bindetasche gut aus. Es kommt zu überwiegend hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Paullongrundkörper und den Aminosäuren ILE597, LEU588, GLU344 und PHE343. Der 3-Chlor-Substituent des Paullons tritt in Wechselwirkung mit einer kleinen Bindetasche, die durch LEU588, TYR595, SER617, VAL618 und ILE619 gebildet wird und durch überwiegend hydrophobe Oberflächen gekennzeichnet ist. Der 9-Brom-Substituent besetzt eine zweite kleine Bindetasche, die durch GLU344, LYS513, LEU516, LYS548 und GLN583 dargestellt



wird, wobei es in diesem Bereich zu einer geringfügigen Überschneidung der Moleküloberflächen kommt. Nahe dem Indolstickstoff  $N^{12}$  wird durch ILE597 eine Barriere gebildet, die das Binden von  $N^{12}$ -substituierten Paullonen sterisch behindern würde. Besondere Bedeutung kommt bei der gewählten Ligandenkonformation der Aminosäure PHE586 zu. So werden Wasserstoffbrücken vermutet, an denen PHE586 beteiligt ist. Die Wasserstoffbrücken wurden zu Beginn des Protein-Liganden-*docking* in Form von *constraints* festgelegt. Idealerweise sollten dabei Wasserstoffbrücken einen N-H...O-Winkel nahe 180 ° aufweisen und einen Winkel von 110 ° nicht unterschreiten.<sup>97</sup> Die Bindungslänge, gemessen zwischen den beiden schweren Atomen, kann dabei bis etwa 4 Å betragen.<sup>98</sup> Durch das terminale Amid am  $N^6$ -Substituenten des Paullons wird eine moderate Wasserstoffbrücke zum *backbone*-Carbonylsauerstoff von PHE586 unter einem Winkel von 148 ° und mit einer Länge von 2.85 Å eingegangen.

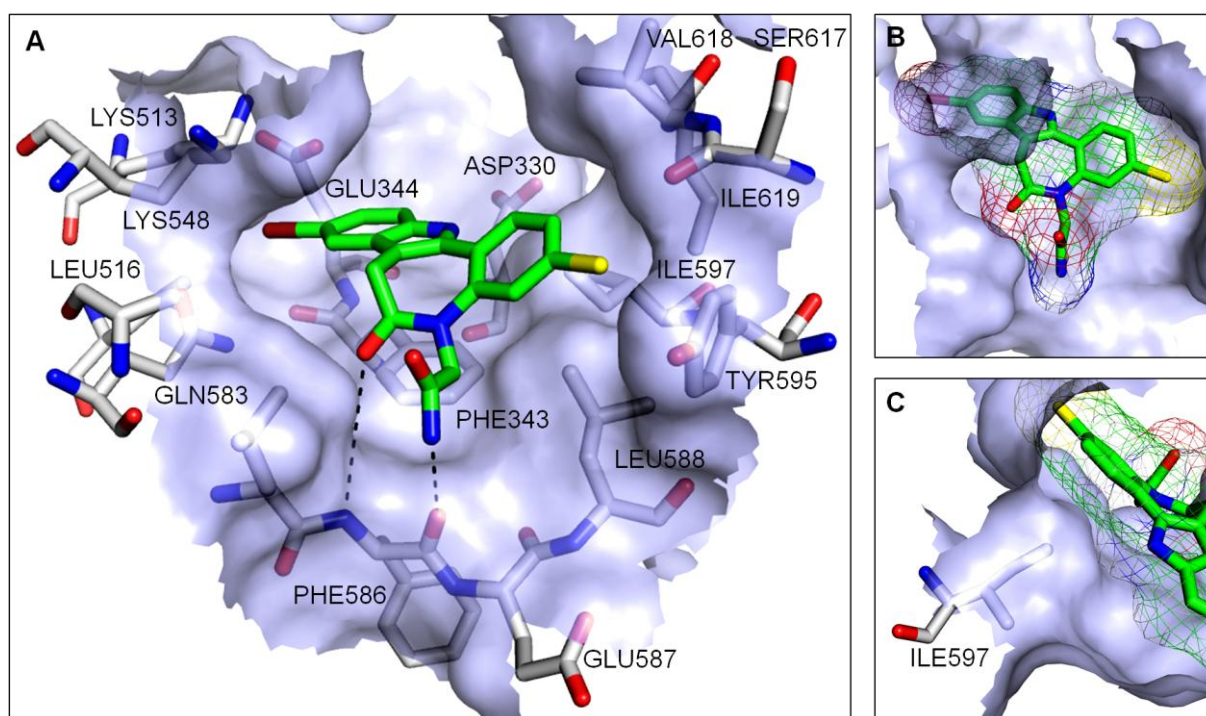


Abbildung 3-4: Bindungsmodus des Paullon- $N^6$ -acetamids **36d** in der *L/TryS*. **A**: Inhibition der ATP-Bindetasche mit Bezeichnung wichtiger Aminosäuren, mögliche polare Wechselwirkungen sind als unterbrochene schwarze Linien dargestellt; **B**: Räumliches Ausfüllen der Bindetasche durch das Paullon; **C**: Detaildarstellung der Barriere durch ILE597; die Ligandenoberfläche ist als Netz wiedergegeben.

Zwischen dem Lactamsauerstoff des Paullons und dem *backbone*-Stickstoff von PHE586 kann es möglicherweise zur Ausbildung einer weiteren Wasserstoffbrücke kommen, die jedoch weniger Einfluss auf die Bindungsaffinität des Liganden besitzt. So entspricht der Winkel N-H...O mit 161 ° den Anforderungen an Wasserstoffbrücken. Die beiden schweren

Atome liegen allerdings mit 4.76 Å recht weit voneinander entfernt. Die Distanz entspricht somit nicht mehr den formalen Anforderungen an eine Wasserstoffbrücke.

Der gewählte Bindemodus von **36d** wurde auch auf das Vorhandensein von Halogenbindungen untersucht (Abbildung 3-5). Bei einer Halogenbindung würde das  $\sigma$ -hole des Halogenatoms mit einem anderen elektronenreichen Atom des Proteins, zum Beispiel einem Sauerstoffatom, in Interaktion treten. Das  $\sigma$ -hole stellt dabei ein positives elektrostatisches Potential auf der Oberfläche des Halogens dar, was die Interaktion eines Halogens zu einem weiteren elektronenreichen Atom möglich macht.<sup>99</sup> Für die Ausbildung einer Halogenbindung sind jedoch besondere geometrische Voraussetzungen erforderlich. So sollte der C–X···O-Winkel (X = Cl, Br, I) idealerweise bei 180 ° liegen, darf aber 140 ° nicht unterschreiten.<sup>100</sup> Zudem werden für einen optimalen X···O–C-Winkel (X = Cl, Br, I) in der Literatur Angaben zwischen 120 °<sup>101</sup> bis 180 °<sup>100</sup> gemacht. Eine Halogenbindung zwischen dem 9-Brom-Substituenten des Paullons und dem Protein kann bei der dargestellten Konformation nicht wiedergefunden werden. Betrachtet man den Carbonylsauerstoff von GLN583 als einen möglichen Interaktionspartner des Brom-Substituenten, so sind die Bindungswinkel mit C–Br···O = 127 ° und Br···O–C = 109 ° zu klein. Zudem ist der Abstand zwischen dem Carbonylsauerstoff von GLN583 und dem Bromatom mit 3.48 Å größer als die Summe der van-der-Waals-Radii beider Atome (3.37 Å), was eine Bindungsbildung unwahrscheinlich macht.<sup>101</sup> Der Chlor-Substituent des Paullons richtet sich bei der dargestellten Pose auf das aromatische System von TYR595 und kann unter besonderen geometrischen Bedingungen durch das  $\sigma$ -hole eine Halogenbindung zum  $\pi$ -System des Aromaten ausbilden. Idealerweise sollte der R–Cl··· $\pi_{\text{Zentroid}}$ -Winkel 180 ° und der Cl··· $\pi_{\text{Zentroid}}$ –C<sub>Ph</sub>-Winkel 90 ° betragen, sodass eine T-förmige Anordnung der Bindungspartner zustande kommt. Außerdem sollte der Bindungsabstand der beteiligten Partner nicht mehr als die Summe der van-der-Waals-Radii betragen.<sup>99</sup> Bei der selektierten Pose weichen die Winkel mit R–Cl··· $\pi_{\text{Zentroid}}$  = 151 ° und Cl··· $\pi_{\text{Zentroid}}$ –C3<sub>Ph</sub> = 107 ° (C3 ist das Kohlenstoffatom des Phenylrings der eingeschlossen einen Winkel näher zu 90° bildet) von den idealen geometrischen Bedingungen ab. Der Abstand der beiden betrachteten Gruppen liegt mit 3.93 Å über der Summe der van-der-Waals-Radii. Folglich ist von einem geringen Beitrag einer Halogenbindung zur Bindungsaffinität des Liganden auszugehen. Als ein weiterer möglicher Bindungspartner des Chlor-Substituenten liegt der Carbonylsauerstoff von SER617 in räumlicher Nähe. Hier liegt jedoch der Cl···O–C-Winkel bei 123 ° und der C–Cl···O-Winkel bei 137 ° und entspricht damit formal nicht den Bedingungen einer Halogenbindung. Die Distanz zwischen den beiden Atomen liegt auch hier mit 3.95 Å über der Summe der van-der-Waals-Radii.



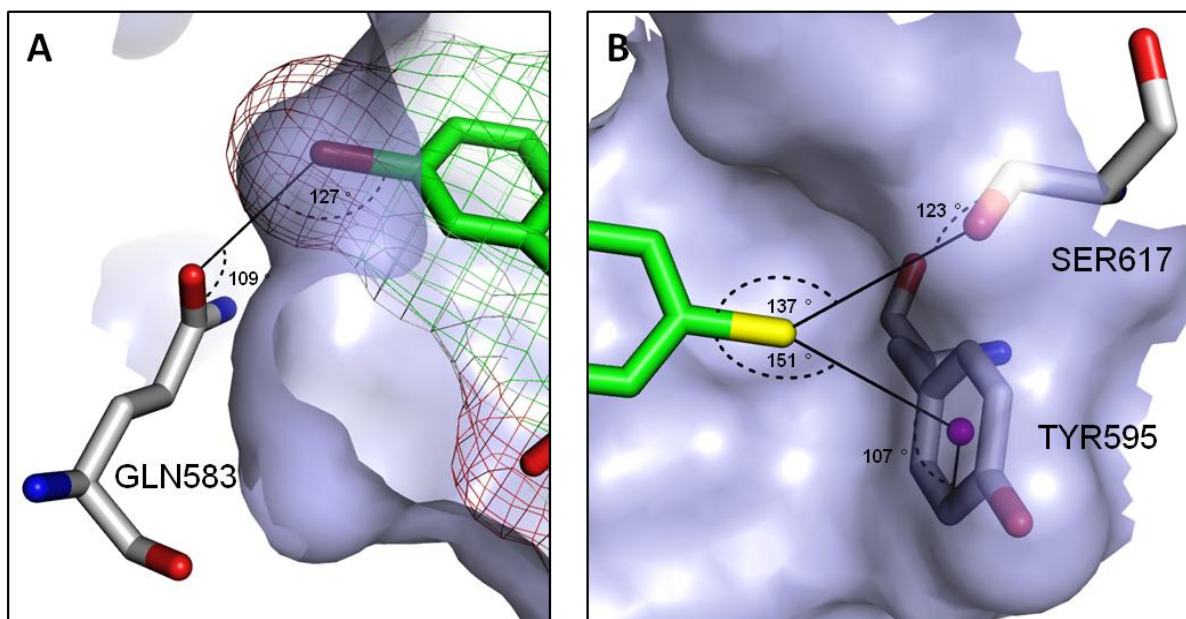


Abbildung 3-5: Untersuchungen zu möglichen Halogenbindungen der Verbindung **36d** in der ATP-Bindetasche der *L*TryS. **A**: Untersuchung zur Wechselwirkung des Brom-Substituenten mit der *L*TryS. Es kommt zu einer leichten Überschneidung der Moleküloberflächen (Oberfläche des Liganden als Netz, Oberfläche *L*TryS blau); **B**: Untersuchungen zur Wechselwirkung des Chlor-Substituenten.

In den Abbildungen 3-6 bis 3-8 sind Posen von *N*<sup>5</sup>-substituierten Paullonen dargestellt, die im *docking* vielversprechende Interaktionen mit der *L*TryS gezeigt haben. Der Lactamsauerstoff der abgebildeten Liganden positioniert sich in Richtung des *backbone*-Amidstickstoffs der Aminosäure PHE586. Es kommt zur Ausbildung von Winkeln zwischen den beteiligten schweren Atomen und dem Wasserstoffatom von 153° (Verbindung **36p**) bis zu 167° (Verbindung **36h**). Die Winkel liegen damit in einem Bereich, der für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken akzeptiert wird. Die Distanz zwischen den einzelnen schweren Atomen ist allerdings mit 4.52 Å (Verbindung **36k**) bis 4.84 Å (Verbindungen **36g** und **36h**) sehr groß, sodass diese Wechselwirkungen kaum Wasserstoffbrücken-Stärke erreichen. Folglich werden diese vermuteten Wechselwirkungen wenig zur Bindungsaffinität des Liganden beitragen. Die Wasserstoffbrücke zwischen dem Amidstickstoff des *N*<sup>5</sup>-Substituenten am Paullon und dem *backbone*-Carbonylsauerstoff von PHE586 liegt für die in den Abbildungen 3-6 bis 3-8 gezeigten Verbindungen mit Winkeln von 147° (Verbindung **36i**) bis zu 161° (Verbindung **36p**) und Distanzen von 2.80 Å (Verbindung **36p**) bis zu 3.02 Å (Verbindungen **36h**, **36j** und **36m**) im Rahmen von moderaten Wasserstoffbrücken. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Wechselwirkungen zur Affinitätserhöhung der Liganden an der *L*TryS beitragen. Durch das Einführen von Substituenten mit tertiären Amiden am Lactamstickstoff wird die Ausbildung einer analogen Wasserstoffbrückenbindung verhindert.

So konnten bei den *docking*-Untersuchungen von Verbindung **36t**, **36u** und **36v**, die ebenfalls ohne die Verwendung von *constraints* durchgeführt wurden, keine Posen gefunden werden, die der Konformation des Alsterpaullons (**39**) in der GSK-3 gleichen. Ergebnisse aus diesen *docking*-Untersuchungen sind graphisch nicht dargestellt. Durch schrittweises Einführen von aliphatischen Resten am Paullon-*N*<sup>5</sup>-acetamid, die von Methyl- über Ethyl- hin zum *tert*-Butyl-Rest sterisch anspruchsvoller werden, sollten hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Liganden und dem Enzym im aromatischen Bereich der Aminosäure PHE586 erzeugt werden.

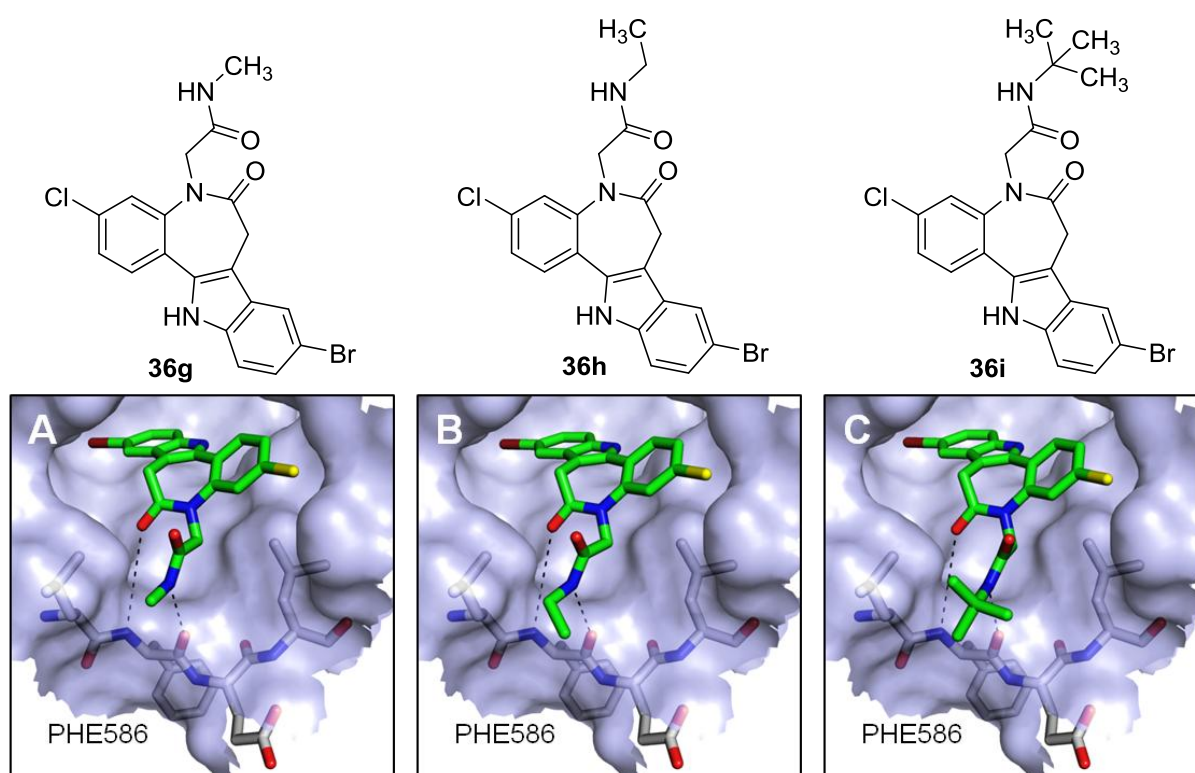


Abbildung 3-6: Ausgewählte Posen der Verbindungen **36g** (A), **36h** (B) und **36i** (C) in der ATP-Bindetasche der *Li*TryS. Mögliche Wechselwirkungen sind als schwarze unterbrochene Linien dargestellt.

Weiterführend zeigten im *docking* die primären Alkoholfunktionen der *N*<sup>5</sup>-substituierten Paullone **36j** und **36k** zusätzliche moderate Wasserstoffbrücken zum *backbone*-Carbonylsauerstoff von PHE586, die mit Bindungswinkeln von 150 ° und 153 ° und Distanzen von 2.90 Å und 2.93 Å die Bindungen der Liganden stärken sollten. Für die Verbindungen **36k** wird eine weitere Wasserstoffbrücke mit 160 ° und 3.07 Å indiziert, die die Wichtigkeit von PHE586 für die gewählte Pose unterstreicht. Eine Sonderstellung nehmen die Verbindungen **36e** und **36f** ein. Bei diesen Paullonen fehlt die Amid-Partialstruktur in der Seitenkette. Durch die terminale Alkoholfunktion von **36e** wird dennoch eine

Wasserstoffbrücke zum *backbone*-Carbonylsauerstoff von PHE586 aufgebaut. Bei Verbindung **36f** ist dieser primäre Alkohol gegen ein primäres Amin ausgetauscht, das bei physiologischen pH-Werten überwiegend protoniert vorliegt. Die resultierende ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke mit  $155^\circ$  und  $2.84 \text{ \AA}$  zum *backbone*-Carbonylsauerstoff von PHE586 sollte stärker zur Bindungsaffinität des Liganden beitragen, als die entsprechende polare Wechselwirkung bei Verbindung **36e**.

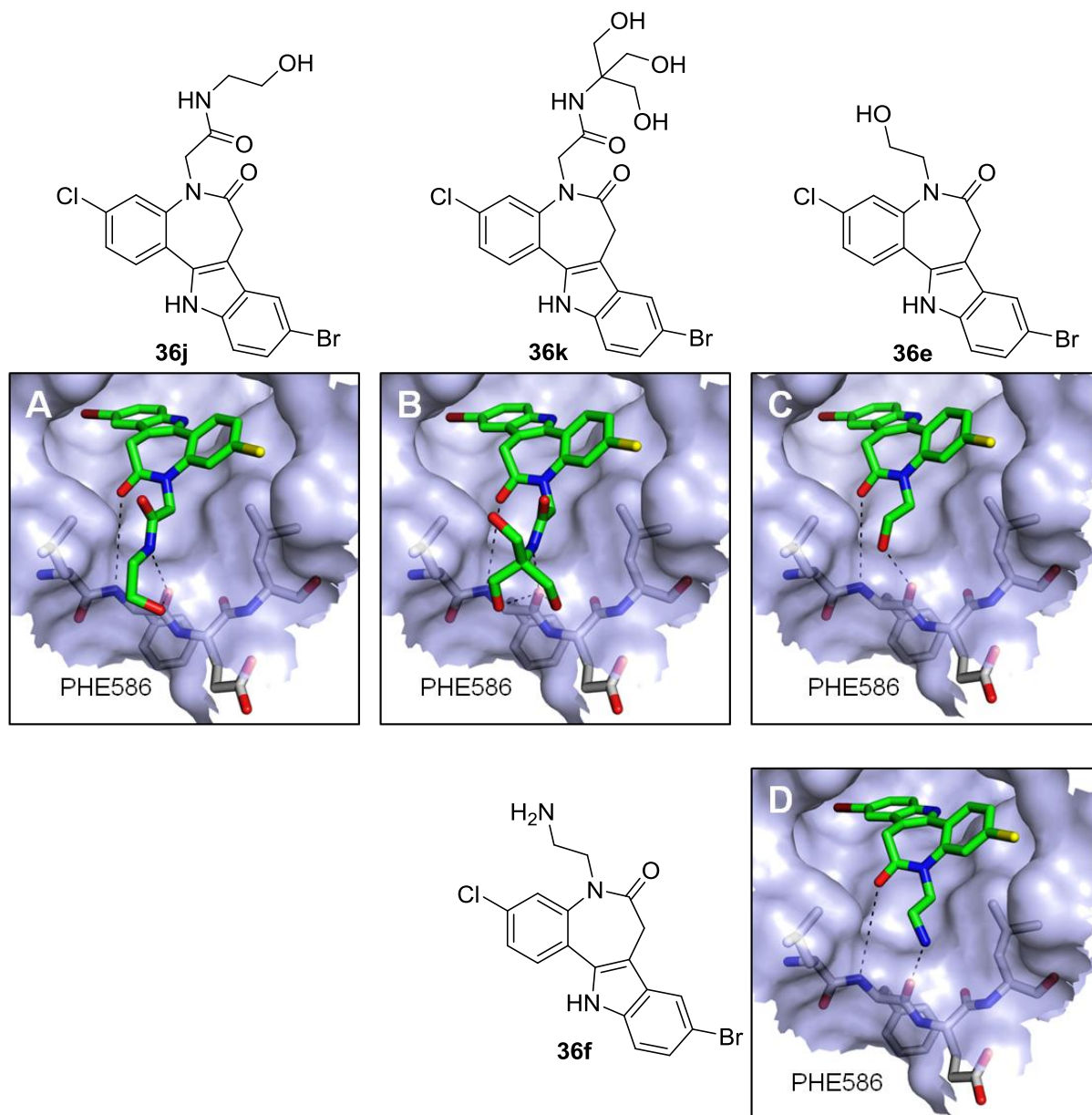


Abbildung 3-7: Selektierte Posen der Verbindungen **36j** (A), **36k** (B), **36e** (C) und **36f** (D) in der ATP-Bindetasche der LTryS. Mögliche Wechselwirkungen sind als schwarze unterbrochene Linien dargestellt.

Durch das Einführen eines Kohlenstoffspacers am Amidstickstoff des  $N^6$ -Substituenten mit einem sich anschließenden basischen Stickstoff, der bei einigen Verbindungen eine Verknüpfung zu einem aliphatischen 6-Ring, wie Piperidin, Morpholin oder 4-Methylpiperazin darstellt, sollten ladungsunterstützte Interaktionen zu PHE586 oder zum Carboxylat von GLU587 erzeugt werden. Die Abbildung 3-8 zeigt zwei Beispiele für mögliche Interaktionen. So wird bei Verbindung **36m** eine ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke zu PHE586 mit einem Bindungswinkel von  $165^\circ$  und einer Distanz von  $2.97 \text{ \AA}$  zwischen den beteiligten schweren Atomen erzwungen. Bei Verbindung **36p** wird durch den terminalen basischen Stickstoff des Piperazins eine ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke zu GLU587 ( $162^\circ$ ,  $2.98 \text{ \AA}$ ) aufgebaut. Da in diesem Bereich sich entgegengesetzte Ladungen gegenüberstehen, führen ionische Wechselwirkungen zwischen dem protonierten basischen Stickstoff und dem Carboxylat von GLU587 zu besonders starker Interaktion. In diesem Bereich kommt es zur Ausbildung einer Salzbrücke.

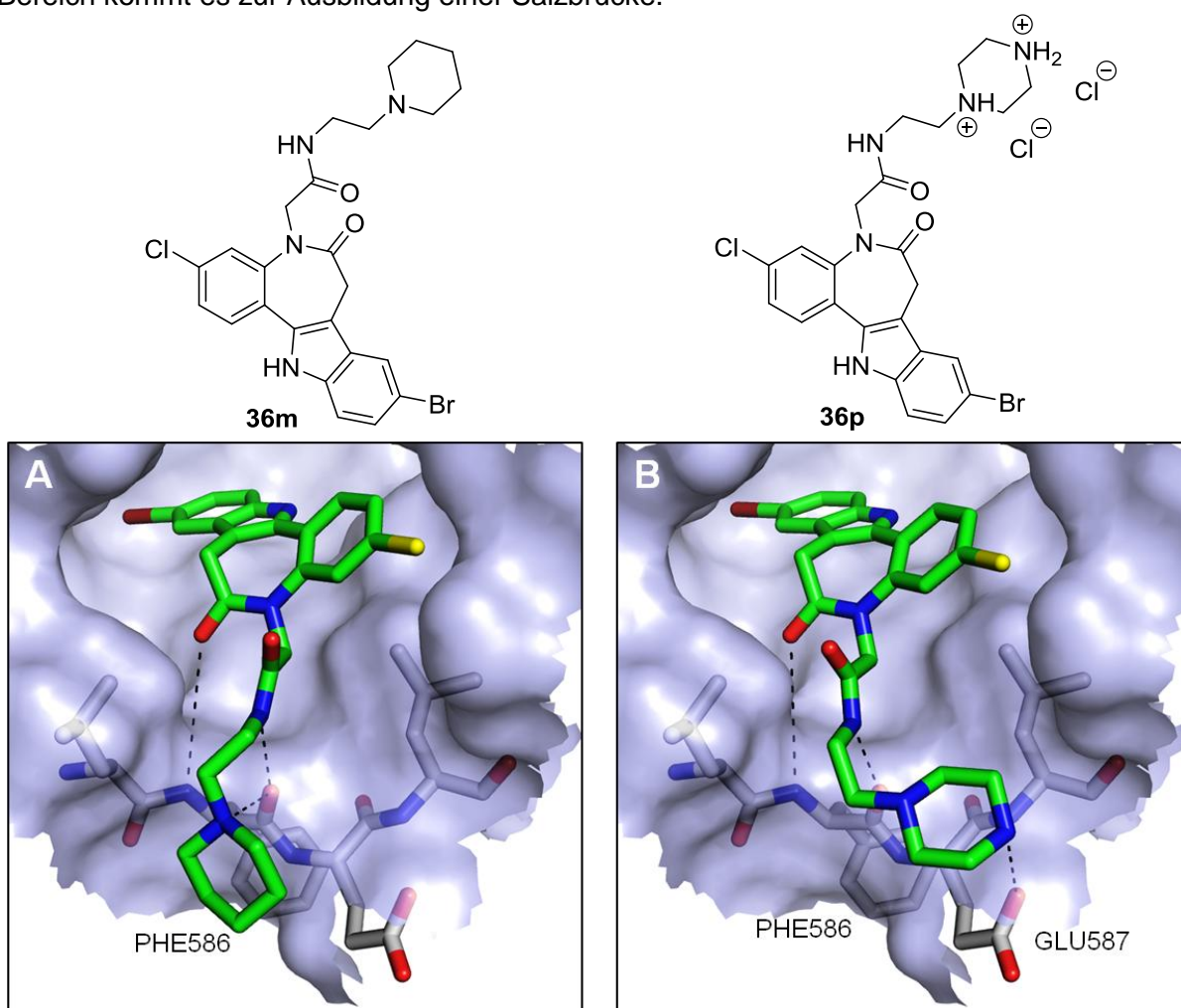


Abbildung 3-8: Posen der Verbindungen **36m** (A) und **36p** (B) in der ATP-Bindetasche der *L*TryS. Mögliche polare Wechselwirkungen sind als schwarze unterbrochene Linien dargestellt.



Beim *docking* des disubstituierten Paullons **37d** zeigt sich, dass der Ligand aufgrund des voluminösen  $N^{12}$ -Substituenten nicht die Bindetasche belegen kann (Abbildung 3-9). Die Aminosäure ILE597 bildet eine sterische Barriere, die dem  $N^{12}$ -Stickstoff gegenübersteht. Der Paullongrundkörper dreht sich aus der Bindetasche und der Chlor-Substituent wendet sich der Lösungsmittel-offenen Seite der Bindetasche zu.

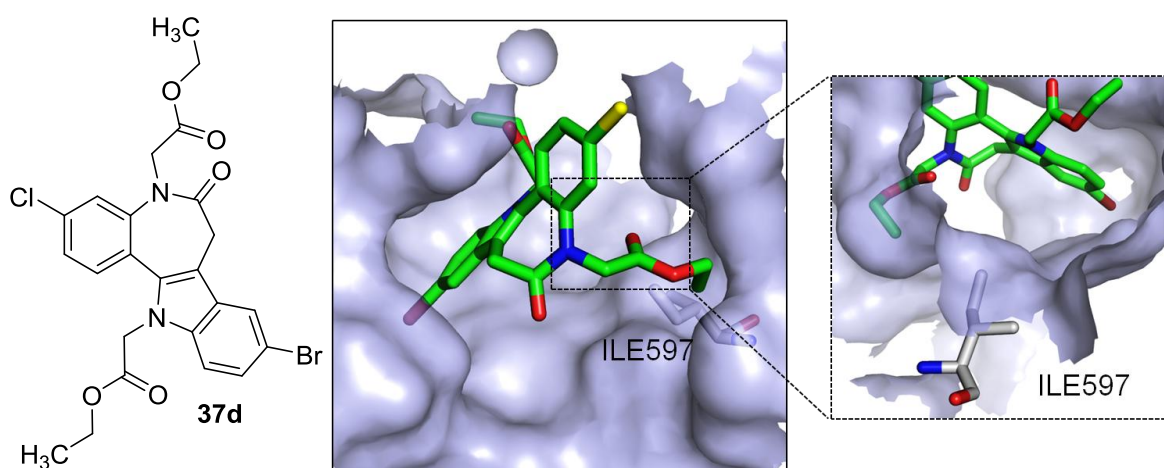
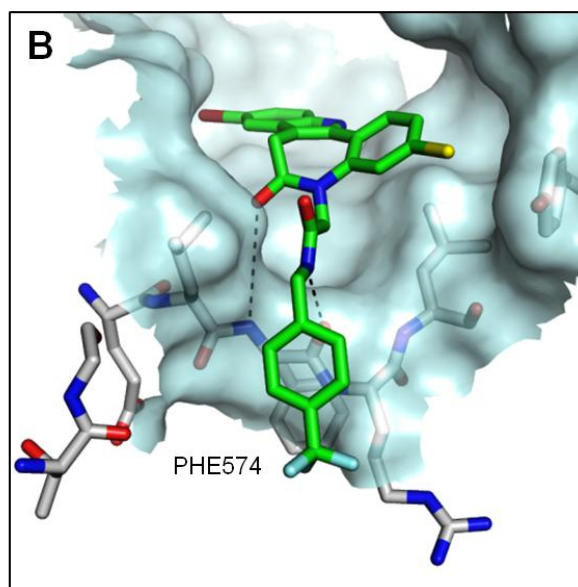
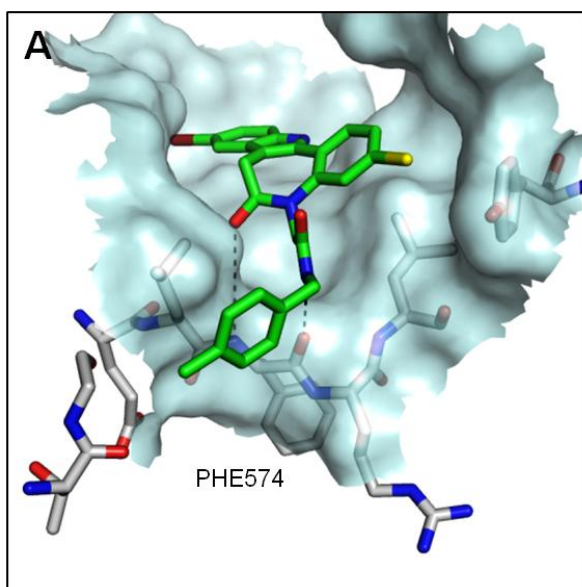
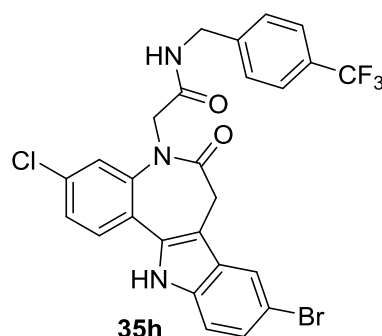
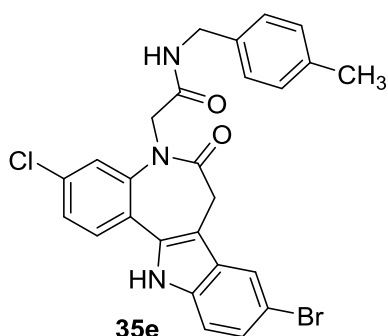


Abbildung 3-9: Pose der Verbindung **37d** in der ATP-Bindetasche der *LITryS*. rechts: ILE597 bildet eine sterische Barriere, die das Binden des  $N^{12}$ -Substituenten verhindert.

Wie bereits zu Beginn des Kapitels besprochen, ist der Spalt an der Aminosäure PHE586 bei den Modellen der *TcTryS* und der *TbTryS* besonders schmal. Dieser Spalt liegt bereits außerhalb der ATP-Bindetasche. Durch den schmalen Spalt wird das Binden von sterisch anspruchsvollen Substituenten gehindert. Aus diesem Grund wurde versucht, diese beiden spezifischen TryS mit Paullonen zu adressieren, die aromatische Substituenten terminal am  $N^6$  tragen. Es wurde vermutet, dass die flachen aromatischen Systeme auch Platz in diesem räumlich begrenzten Bindespalt finden. Ähnliche Überlegungen wurden bereits von KORN dargelegt.<sup>102</sup> Aus dem *docking* der Verbindungen **35** in die *TcTryS* lässt sich eine Analogie zum *docking* von  $N^6$ -substituierten Paullonen in die *LITryS* erkennen. So besetzt der 3-Chlorkenpaullon-Grundkörper mit einer ähnlichen Konformation die ATP-Bindetasche. Es wurde vermutet, dass der Lactamsauerstoff eine Interaktion mit dem *backbone*-Amidstickstoff von PHE574 eingeht. Abmessungen der Winkel der in den Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11 dargestellten Verbindungen liegen dabei zwischen 151 ° (**35k**) und 162 ° (**35f**). Die Distanzen zwischen den beteiligten schweren Atomen sind mit 4.57 Å (**35c**) bis 4.99 Å (**35f**) für die sieben repräsentativen Verbindungen sehr groß, sodass die möglichen Wechselwirkungen kaum Wasserstoffbrückencharakter erreichen werden.

Wasserstoffbrücken zwischen dem Amidstickstoff in der  $N^5$ -Seitenkette des Paullons und dem Carbonylsauerstoff von PHE574 werden für die Verbindungen **35d**, **35e**, **35f**, **35h** und **35k** indiziert. Diese liegen im Bereich von moderaten bis schwachen Wasserstoffbrücken (**35d**: 163 °, 2.75 Å; **35e**: 2.82 Å, 162 °; **35f**: 126 °, 3.05 Å; **35h**: 2.75 Å, 163 °; **35k**: 2.70 Å, 151 °). Die *docking*-Untersuchung der Verbindung **35c** zeigt, dass sich der  $N^5$ -Carbonylsauerstoff in Richtung des *backbone*-Amidstickstoffs von PHE574 ausrichtet und eine Wasserstoffbrücke unter einem Bindungswinkel von 150 ° mit einer Länge von 3.02 Å eingegangen wird. Durch diese eingenommene Konformation des Liganden wird jedoch die Proteinoberfläche im Umfeld dieser Wasserstoffbrücke geschnitten. Die Verbindungen **35e** und **35h** besetzten mit dem *para*-Methylbenzyl- und dem *para*-Trifluormethylbenzyl-Substituenten eine hydrophobe Bindetasche, die sich an die Aminosäure PHE574 anschließt. In diesem Bereich kommt es zu hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Zielenzym. Für die Verbindungen **35k** und **35f** konnten bei den *docking*-Untersuchungen polare Interaktionen zu spezifischen Aminosäuren der TcTryS wiedergefunden werden. So orientiert sich der Pyridin-Substituent der Verbindung **35k** in Richtung LEU576 und geht mit dem *backbone*-Amidstickstoff eine Wasserstoffbrücke ein (3.84 Å, 165 °).



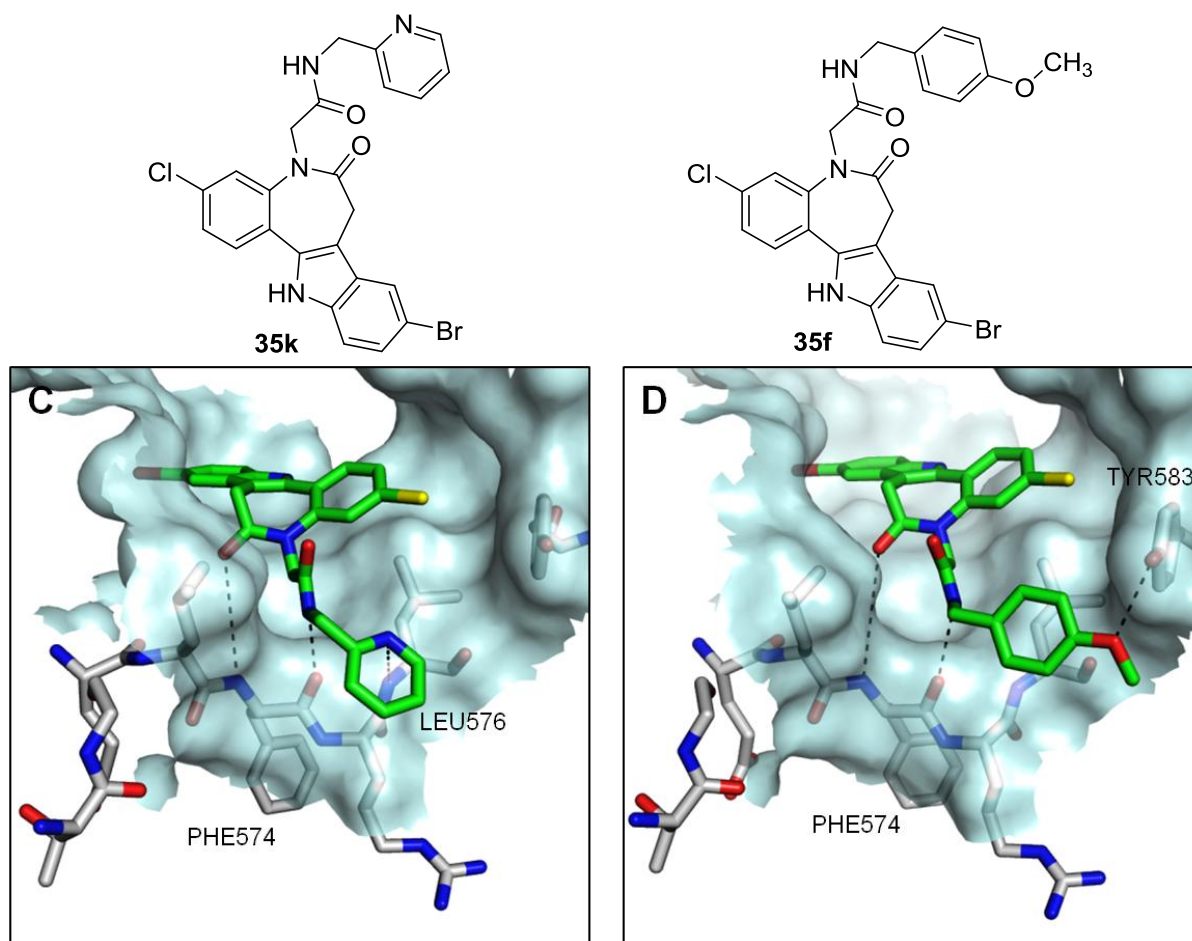


Abbildung 3-10: Belegung der ATP-Bindetasche der *TcTryS* durch die Verbindungen **35e** (A), **35h** (B), **35k** (C) und **35f** (D). Vermutete Wechselwirkungen zum Enzym sind als schwarze unterbrochene Linien verdeutlicht.

Die Verbindung **35f** richtet sich mit dem Methoxy-Substituenten auf die phenolische Hydroxylgruppe von TYR583 und bildet mit dieser Aminosäure ebenfalls eine Wasserstoffbrücke (2.99 Å, 130 °). Aus der Abbildung 3-10 wird außerdem ersichtlich, dass der aromatische Substituent am *N*<sup>5</sup> ein großes Maß an Bewegungsfreiheit besitzt und die Position des Aromaten in der Bindetasche bei den einzelnen Posen variiert.

Für die chloresubstituierten Derivate **35c** und **35d** konnten mögliche schwache Halogenbindungen zum *backbone*-Carbonylsauerstoff von THR531 identifiziert werden, wie in Abbildung 3-11 gezeigt. Die Bindungswinkel von **35c** ( $\text{C}-\text{Cl}\cdots\text{O} = 170^\circ$ ;  $\text{Cl}\cdots\text{O}-\text{C} = 142^\circ$ ) und **35d** ( $\text{C}-\text{Cl}\cdots\text{O} = 166^\circ$ ;  $\text{Cl}\cdots\text{O}-\text{C} = 157^\circ$ ) entsprechen den Anforderungen an Halogenbindungen, die in der Literatur gemacht werden.<sup>100, 101</sup> Jedoch sind die beteiligten Atome mit 4.40 Å für **35c** und 3.55 Å für **35d** weiter als die Summe der beiden

van-der-Waals-Radii (3.27 Å) entfernt, sodass mögliche Halogenbindungen nur einen geringen Beitrag zur Ligandenaffinität leisten.

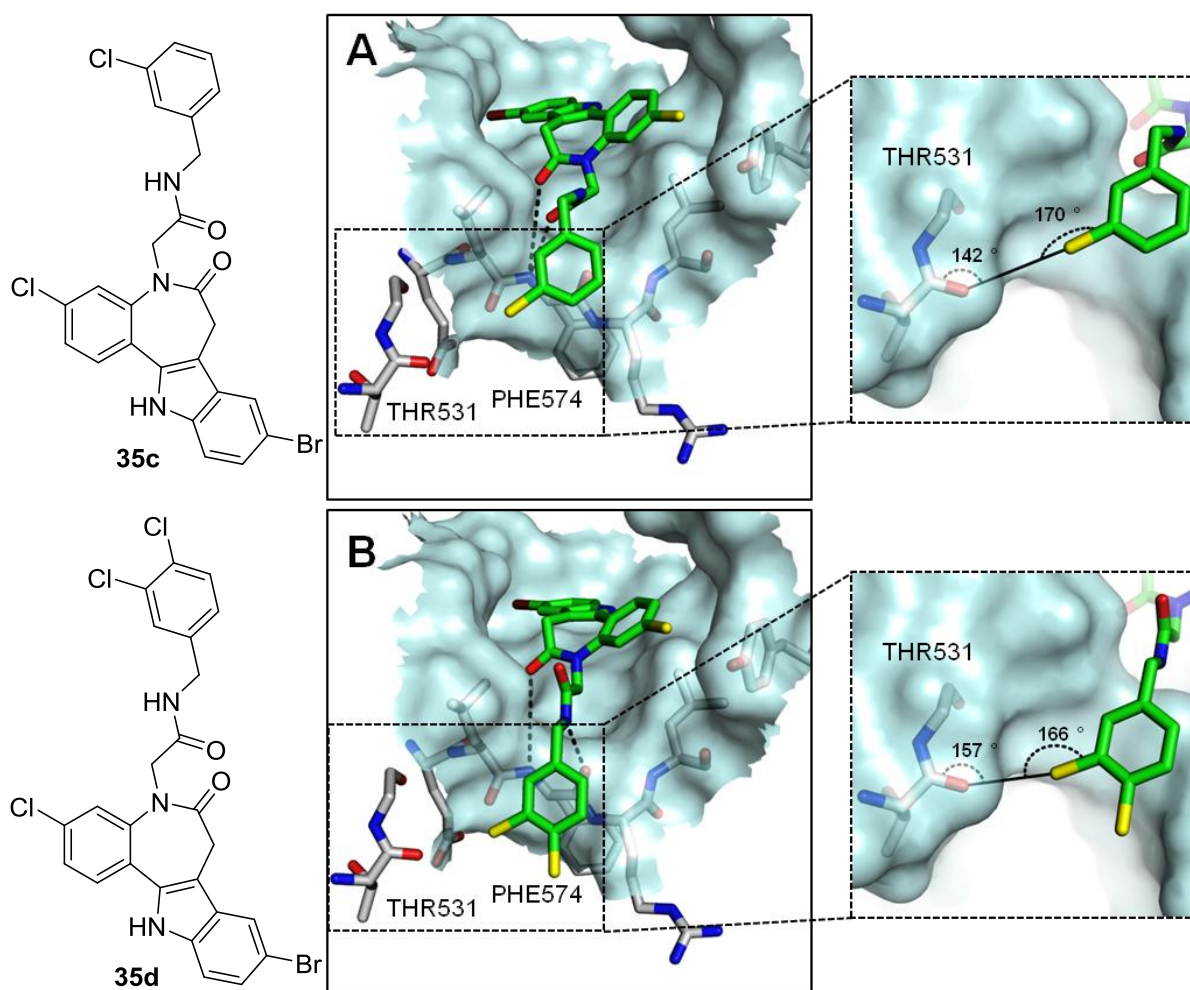


Abbildung 3-11: Posen der Verbindungen **35c** (A) und **35d** (B) in der ATP-Bindetasche der *TcTryS*. Vermutete Wasserstoffbrücken sind als schwarze unterbrochene Linien dargestellt. *rechts*: Untersuchungen zu möglichen Halogenbindungen der Chlorsubstituenten mit dem Carbonylsauerstoff von THR531.

Schwerpunktmäßig wurden durch *docking*-Untersuchungen mögliche Interaktionen der Verbindungen **35** mit der *TbTryS* analysiert. Die in Abbildung 3-12 und Abbildung 3-13 dargestellten Verbindungen orientieren sich mit dem Lactamsauerstoff und dem  $N^5$ -Amidstickstoff in der bereits beschriebenen Weise in Richtung des *backbone*-Amidstickstoffs und des *backbone*-Carbonylsauerstoffs von PHE580. Die Winkel liegen für die Interaktion zum *backbone*-Amidstickstoff von PHE580 zwischen 141° (**35g**) und 152° (**35d**). Mit Distanzen von 4.49 Å (**35j**) bis 4.75 Å (**35d**) sind die beteiligten schweren Atome jedoch sehr weit voneinander entfernt, sodass es wahrscheinlich nicht zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke kommt. Die indizierten Wasserstoffbrücken zwischen dem  $N^5$ -



Amidstickstoff von **35d**, **35g** und **35j** und dem *backbone*-Carbonylsauerstoff von PHE850 liegen mit Winkeln von 151 °(**35j**) und 154 °(**35d**, **35g**) und Distanzen zwischen 2.69 Å (**35g**) und 3.05 Å (**35d**) vor. Weitere spezifische polare Wechselwirkungen konnten für die Verbindungen **35g** und **35j** gefunden werden. So geht **35g** über die phenolische Hydroxylgruppe eine Wasserstoffbrücke zum *backbone*-Carbonylsauerstoff von ILE582 (3.10 Å, 159 °) ein. **35j** bildet mit dem Pyridin-Substituenten eine Wasserstoffbrücke zum *backbone*-Amidstickstoff von ILE582 (3.16 Å, 168 °) aus.

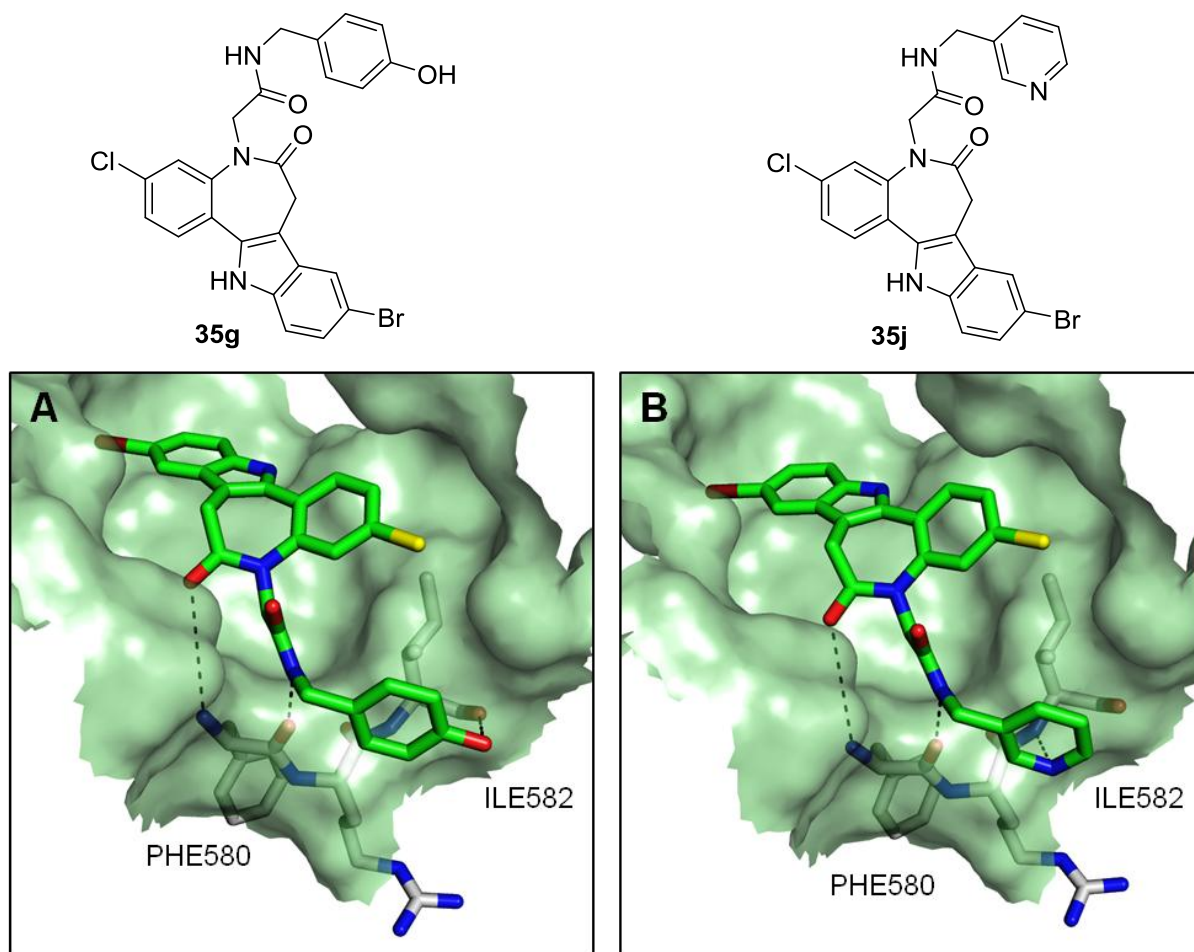


Abbildung 3-12: Bindungsmodi der Verbindungen **35g** und **35j** in der ATP-Bindetasche der TbTryS. Mögliche polare Interaktionen sind als schwarze unterbrochene Linien dargestellt.

Für die Verbindung **35d** konnte eine Pose gefunden werden, in der sich ein Chlorsubstituent des terminalen Benzylrings in Richtung des *backbone*-Carbonylsauerstoffs von THR537 orientiert. Die Winkel der sich möglicherweise ausbildenden Halogenbindung liegen mit  $\text{Cl}\cdots\text{O}-\text{C} = 128^\circ$  und  $\text{C}-\text{Cl}\cdots\text{O} = 158^\circ$  dabei im Rahmen von Halogenbindungen. Allerdings liegen auch bei dieser Pose das Halogen- und das Sauerstoffatom mit 4.01 Å sehr weit

voneinander entfernt, sodass nur von einem geringen Beitrag der Bindung zur Bindungsaffinität des Liganden auszugehen ist.

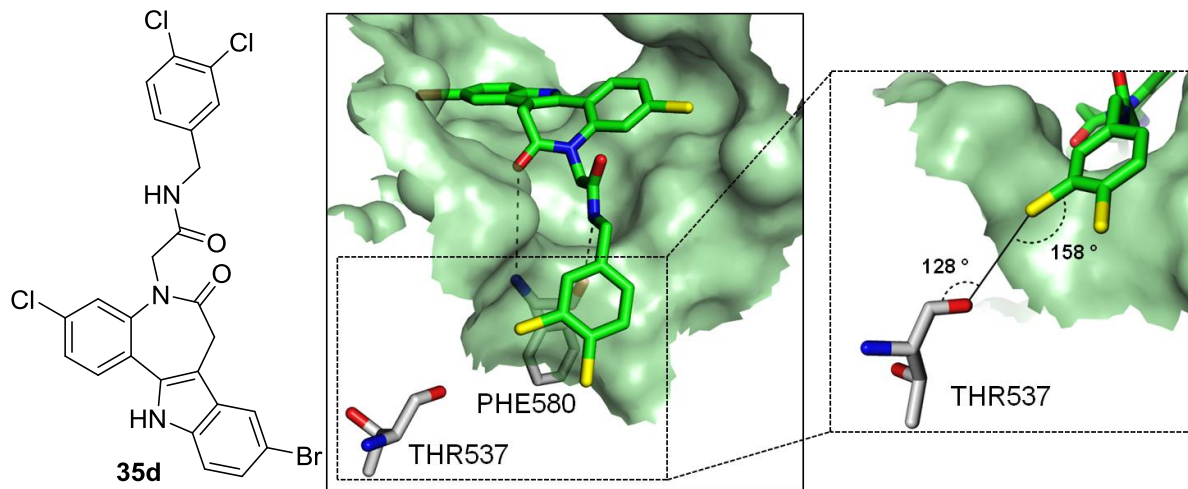


Abbildung 3-13: Pose der Verbindungen **35d** in der ATP-Bindetasche der TbTryS. Mögliche Wasserstoffbrücken sind als schwarze unterbrochene Linien dargestellt. *rechts*: Analyse einer möglichen Interaktion eines Chlorsubstituenten von **35d** mit dem *backbone*-Carbonylsauerstoff von THR537.

### 3.1.2 Bindungsmodus der substituierten Paullone abgeleitet vom Spermidin-kompetitiven Verhalten $N^{\delta}$ -substituierter Paullone

Nach Untersuchungen von BENÍTEZ *et al.* verhalten sich einige  $N^{\delta}$ -substituierte Paullone kompetitiv gegenüber Spermidin, was eine Interaktion des Inhibitors auch mit der Spermidin-Bindetasche wahrscheinlich macht. Die *L*TryS bindet, im Gegensatz zur *Tb*TryS und *Tc*TryS, weniger effizient Spermidin. Eine Interaktion der Paullone mit der Spermidin-Bindetasche würde in diesem Fall besonders zur Hemmung der *L*TryS beitragen. Diese von BENÍTEZ *et al.* postulierte Vermutung würde die selektive Inhibition der *L*TryS durch Paullone erklären.<sup>80</sup> Da einige Paullone mit Aktivität an der *L*TryS, wie FS-554 (**30**) oder MOL2008 (**31**), ein basisches Stickstoffatom in der  $N^{\delta}$ -Seitenkette besitzen, liegt die Vermutung nahe, dass die basische Seitenkette des Paullons mit der Spermidin-Bindetasche interagiert. Der Paullon-Grundkörper besetzt dabei die ATP-Bindetasche des Enzyms. Spermidin enthält ebenfalls basische Stickstoffatome, sodass die  $N^{\delta}$ -Seitenkette des Paullons möglicherweise Spermidin nachahmt. Dies könnte einen alternativen Ansatz für den Mechanismus der Inhibition der TryS durch  $N^{\delta}$ -substituierte Paullone darstellen.

Beim Protein-Liganden-*docking* verschiedener  $N^{\delta}$ -substituierter Paullone an der *L*TryS wurden mehrfach Posen erhalten, bei denen der 3-Chlorkenpaullonteil des Inhibitors die ATP-Bindetasche verschließt, während der  $N^{\delta}$ -Substituent in Richtung der Spermidin-Bindetasche orientiert ist. Der Substituent interagiert dabei mit einer Kavität, deren Öffnung unter anderem durch die Aminosäuren ASP330, ILE619, GLY621 und ILE597 gebildet wird. Diese Kavität liegt in direkter räumlicher Nähe zur Spermidin-Bindetasche. Aus der Abbildung 3-14 ist ersichtlich, dass der 3-Chlorkenpaullonteil der Liganden in der gefundenen Konformation keine polaren Wechselwirkungen mit dem Enzym eingeht. Der Paullongrundkörper füllt jedoch den ATP-Spalt gut aus. Durch die Seitenkette kommt es hingegen zur Ausbildung von polaren Wechselwirkungen. Diese Interaktionen liegen im Bereich von Salzbrücken, da bei der Interaktion des Liganden mit dem Enzym entgegengesetzte Ladungen gegenüberliegen. So bildet die Verbindung **36l** eine Salzbrücke zu ASP330 aus (3.11 Å, 166 °) und die Verbindung **36p** tritt in Interaktion mit ASP330 (3.13 Å, 172 °, Salzbrücke) und THR352 (4.17 Å, 135 °). Bei der Interaktion von **36p** mit THR352 liegen die beteiligten schweren Atome jedoch zu weit auseinander, um eine Wasserstoffbrücke aufzubauen. Die Verbindung **36s** geht ebenfalls eine polare Wechselwirkung mit ASP330 in Form einer Salzbrücke ein (3.10 Å, 164 °).

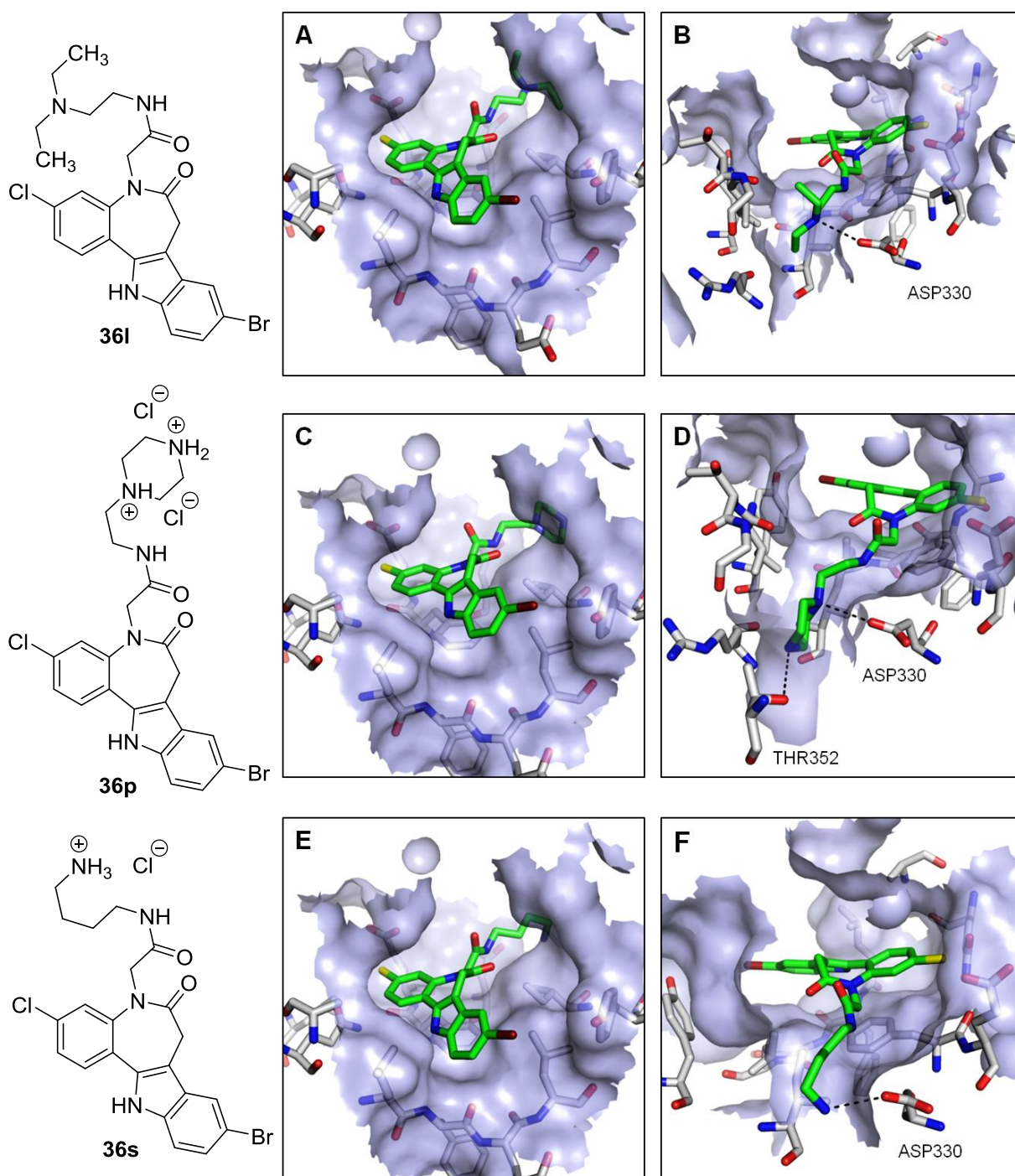


Abbildung 3-14: Hypothetische Bindungsmodi der Verbindungen **36l** (A, B), **36p** (C, D) und **36s** (E, F) in der *LtryS*. Die Grafiken A, C und E zeigen die Verbindungen in der ATP-Bindetasche des Enzyms. Der  $N^6$ -Substituent ist in Richtung der Spermidin-Bindetasche orientiert. Die Grafiken B, D und F zeigen mögliche Wechselwirkungen des jeweiligen  $N^6$ -Substituenten mit dem Enzym nahe der Spermidin-Bindetasche. Die in einer Zeile abgebildeten Posen sind identisch. Mögliche polare Wechselwirkungen sind als schwarze unterbrochene Linien dargestellt.



Auch bei *docking*-Untersuchungen der Derivate **35** mit dem Modell der TcTryS konnten ähnliche Posen wiedergefunden werden, bei denen das Paullon den ATP-Bindespalt ausfüllt und der  $N^5$ -Substituent in Richtung der Spermidin-Bindetasche zeigt. In Abbildung 3-15 sind *docking*-Posen von zwei repräsentativen Verbindungen gezeigt. So belegt bei dem visualisierten Bindemodus der Verbindung **35g** die Phenol-Partialstruktur des Liganden die bereits beschriebene Bindetasche, die teilweise durch polare Oberflächen gekennzeichnet ist. Wasserstoffbrücken konnten jedoch nicht identifiziert werden, weil die Distanz der phenolischen Hydroxylgruppe zu möglichen Bindungspartnern zu groß ist. Auch bei der dargestellten Pose der Verbindung **35i** füllt die Pyridin-Partialstruktur die Bindetasche aus. Wasserstoffbrücken können für den Liganden ebenfalls nicht wiedergefunden werden. Zudem kommt es bei den beiden abgebildeten Posen zu einer leichten Überschneidung der Ligandenoberfläche mit der Proteinoberfläche im Bereich des terminalen Aromaten am  $N^5$ .

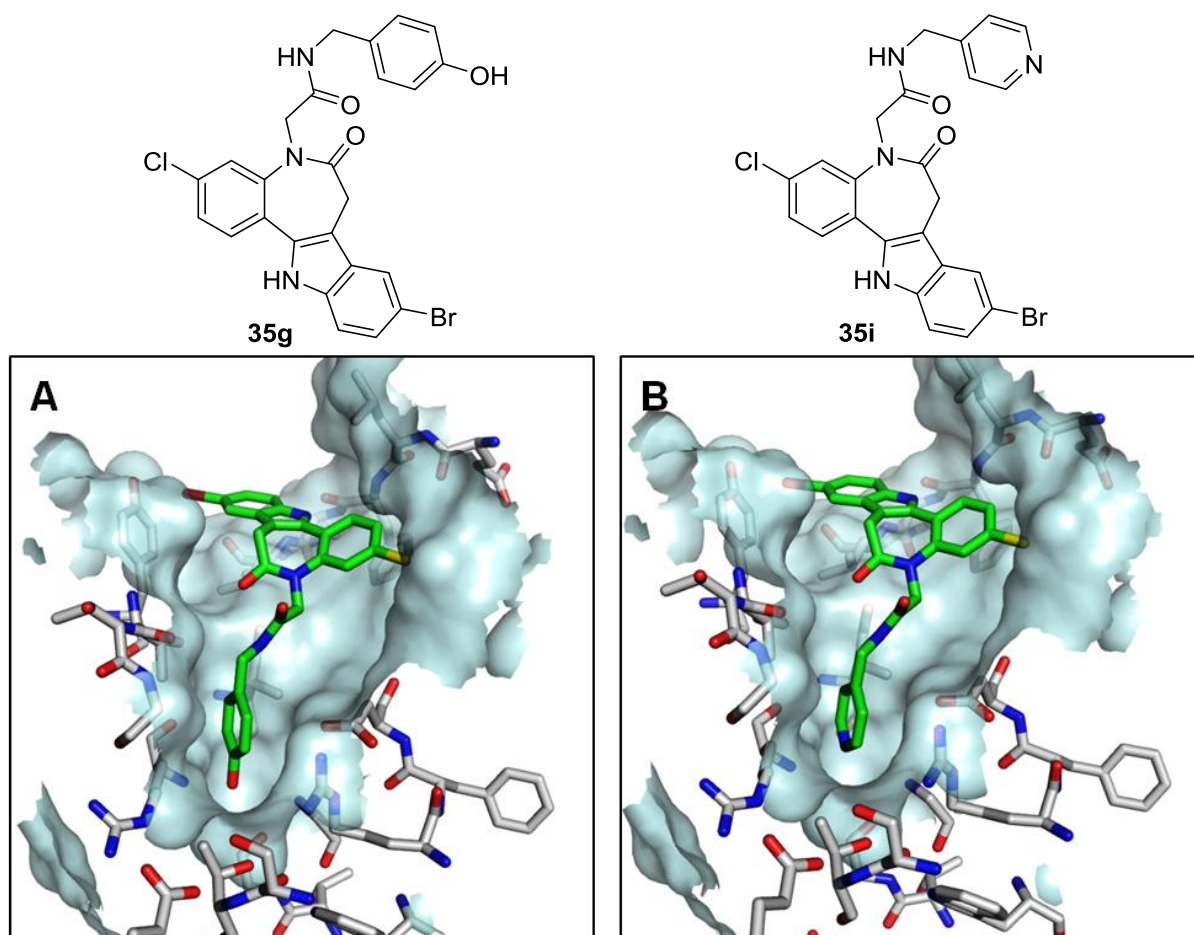


Abbildung 3-15: Bindungsmodi der Verbindungen **36g** (A) und **36i** (B) in der TcTryS. Die Grafiken zeigen die Belegung einer Bindetasche nahe des Spermidin-Bindespalts durch den  $N^5$ -Substituenten.

Untersuchungen zum Bindungsmodus der Derivate **35** in der *TbTryS* zeigen, dass besonders häufig Posen generiert werden, bei denen der  $N^6$ -Substituent aus der ATP-Bindetasche in Richtung Spermidin-Bindetasche orientiert ist (Abbildung 3-16). Die substituierten Paullone nehmen dabei den oben beschriebenen Bindemodus ein. So füllt ein *para*-substituierter Benzylamid-Substituent, wie der *para*-Trifluormethylbenzyl-Substituent der Verbindung **35h**, die bereits erwähnte Bindetasche sehr gut aus. Durch einen Wasserstoffbrücken-Donator in *para*-Position, wie der phenolischen Hydroxylgruppe der Verbindung **35g**, wird zudem eine Wasserstoffbrücke zu GLY593 aufgebaut (3.25 Å, 145 °), woraus sich eine höhere Affinität des Liganden zum Enzym ableiten könnte.

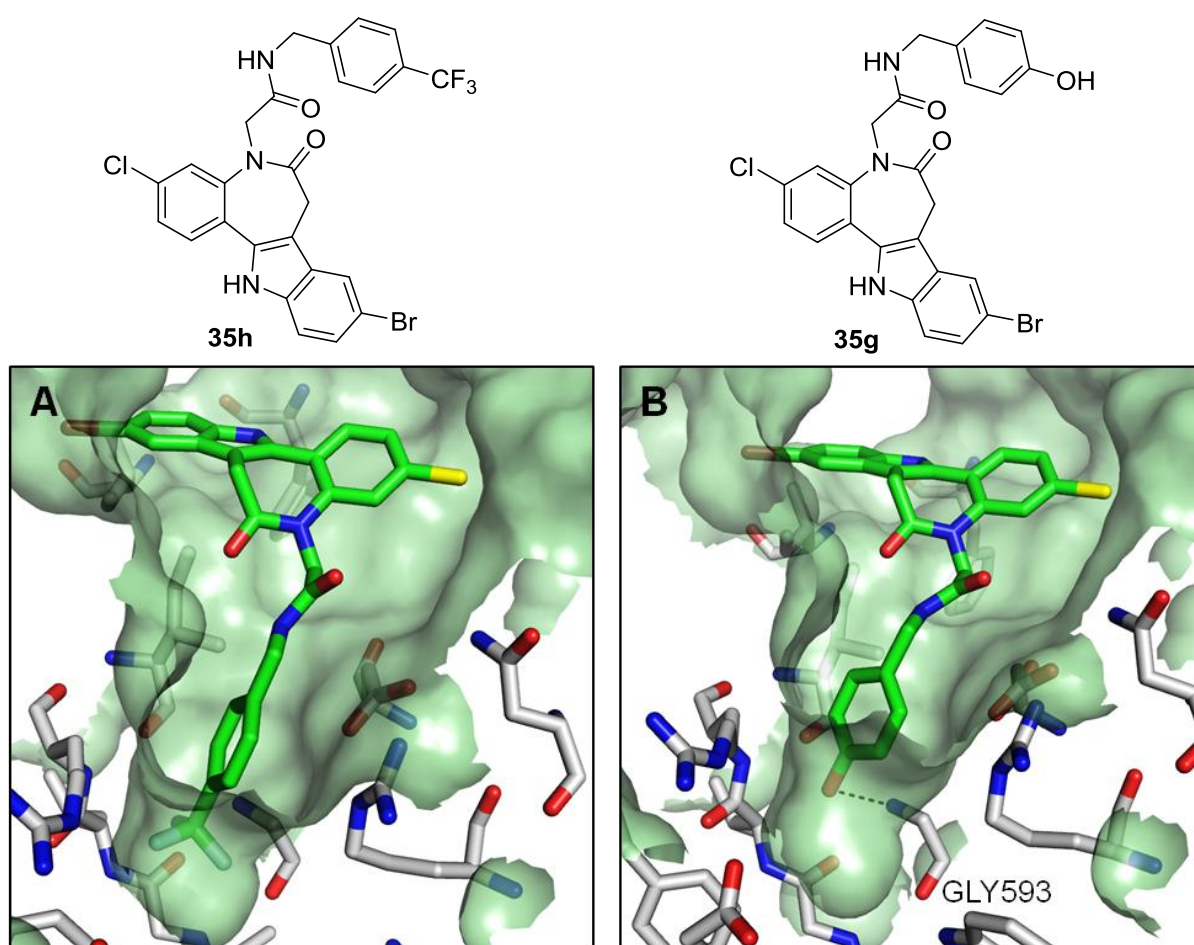


Abbildung 3-16: Posen der Verbindungen **35h** (A) und **35g** (B) in der *TbTryS*. Der  $N^6$ -Substituent zeigt von der ATP-Bindetasche in Richtung der Spermidin-Bindetasche. Eine Wasserstoffbrücke ist als schwarze unterbrochene Linie dargestellt.

### 3.2 Fazit der *docking*-Studien

Die Ergebnisse der *docking*-Untersuchungen sind kritisch zu betrachten. So konnten für die durchgeführten Untersuchungen nur auf Modelle der TryS von *L. infantum*, *T. brucei* und *T. cruzi* zurückgegriffen werden. Kristallstrukturen der drei Enzyme sind zum Zeitpunkt des Niederschreibens dieser Arbeit nicht publiziert. Zudem wurden Modelle verwendet, die weder Wasser noch die für die Orientierung der Substrate nötigen Magnesiumionen enthalten. Mögliche Wechselwirkungen der Liganden mit diesen beiden Interaktionspartnern konnten bei den *docking*-Untersuchungen nicht berücksichtigt werden. Einer der allgemein beschriebenen Bindungsmodi leitet sich von einer rationalen Überlegung ab, die bereits von KOCH<sup>96</sup> publiziert wurde. Hierbei wird eine Analogie zur Kristallstruktur des Alsterpaullons in der GSK-3 (PDB: 1Q3W) als realistisch erachtet. Der andere beschriebene allgemeine Bindungsmodus könnte eine Erklärung liefern, wie *N*<sup>5</sup>-substituierte Paullone mit der ATP- und Spermidin-Bindetasche interagieren und die von BENÍTEZ *et al.*<sup>80</sup> erwähnte Konkurrenz der Paullone mit Spermidin erklären. Inwiefern das *N*<sup>5</sup>-substituierte Paullon durch Interaktion mit einer Bindetasche am Eingang des Spermidin-Bindespalts die Spermidin-Bindung selbst beeinflussen kann, ist unklar. Dennoch können die selektierten *docking*-Posen eine Hilfestellung geben, um weitere sinnvolle Substituenten vorzuschlagen und Ergebnisse aus den biochemischen Testungen zu erklären.

## 4. Synthese

### 4.1 Synthese des 3-Chlorkenpaullons

Für die Synthese der angestrebten Zielstrukturen wurde zunächst das 3-Chlorkenpaullon (**32**, Abbildung 4-1) auf einem von KORN<sup>103</sup> etablierten Syntheseweg präparativ dargestellt. Die einzelnen Synthesestufen beruhen auf bereits publizierten Vorschriften, die nachstehend genannt werden. Die Verwendung dieser Synthesesequenz hatte zum Ziel, das Paullon **32** in quantitativ hohen Ausbeuten durch die Wahl etablierter Reaktionen zu gewinnen.

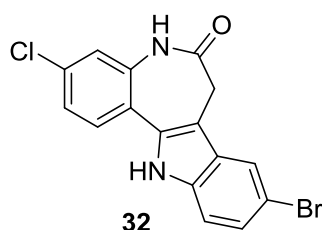
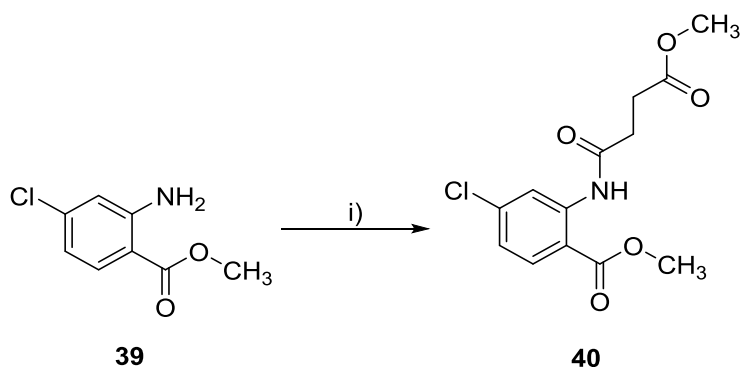


Abbildung 4-1: 3-Chlorkenpaullon (**32**) als Zielstruktur der Synthesesequenz. Die Verbindung wurde anschließend als Edukt im Rahmen weiterer Derivatisierungsreaktionen eingesetzt.

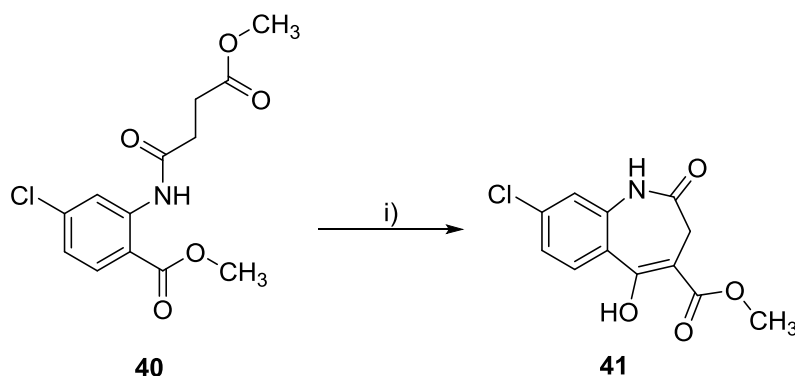
Für die präparative Darstellung von **32** wurde zunächst der 4-Chloranthranilsäuremethylester (**39**) mit Bernsteinsäuremethylesterchlorid zum entsprechenden Amid **40** in getrocknetem Toluol umgesetzt. Als Hilfsbase wurde Pyridin verwendet (Schema 4-1). Dieser erste Reaktionsschritt basiert auf einer Synthesevorschrift von REICHWALD<sup>104</sup>.



Schema 4-1: Synthese des Amids **40**. Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeute: i) Toluol, Pyridin, Bernsteinsäuremethylesterchlorid, 0→80 °C, 2 h, 68–89%.

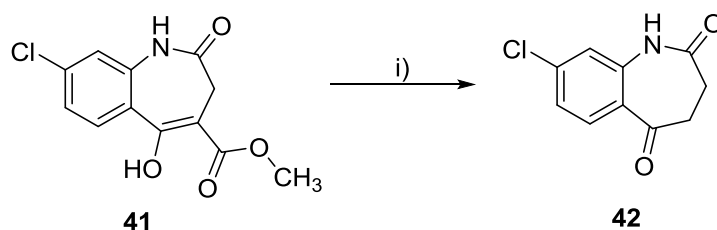


Eine sich anschließende Dieckmann-Esterkondensation unter der Verwendung der organischen Base Kalium-*tert*-butylat in getrocknetem Toluol mit Dimethylformamid lieferte das Synthesezwischenprodukt **41** (Schema 4-2).



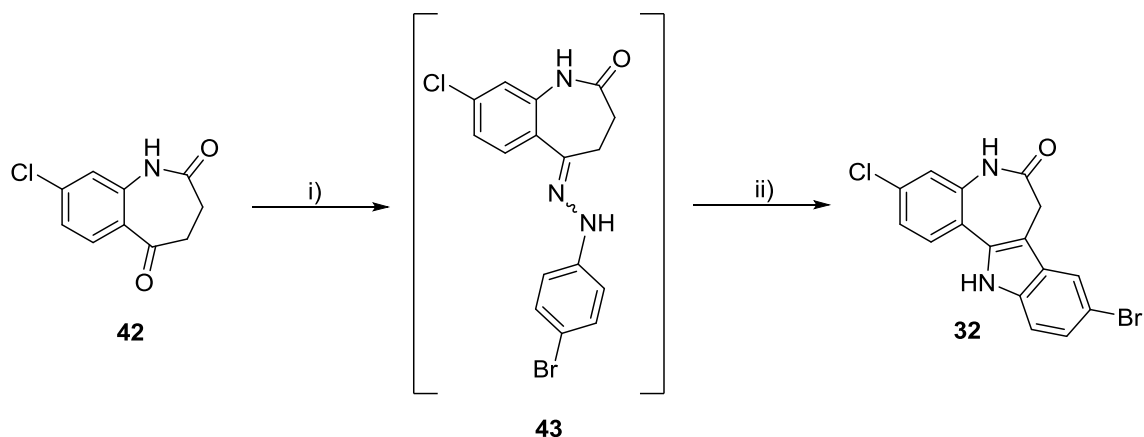
Schema 4-2: Synthese der Verbindung **41** durch eine Dieckmann-Esterkondensation. Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeute: i) DMF, Toluol, KO<sup>t</sup>Bu 0→80 °C, 3,5 h, 41–80%.

Eine Dealkoxycarbonylierung nach SATTLEGER *et al.*<sup>105</sup> in wässrigem Dimethylsulfoxid führte zu der Verbindung **42** (Schema 4-3), wobei auf eine exakte Zusammensetzung des Lösungsmittels zu achten ist. Dimethylsulfoxid und Wasser sollten für die Reaktion in einem Verhältnis von 9:1 verwendet werden.



Schema 4-3: Dealkoxycarbonylierung der Verbindung **41**. Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeute: i) DMSO/H<sub>2</sub>O 9:1, 150 °C, 6 h, 53–84%.

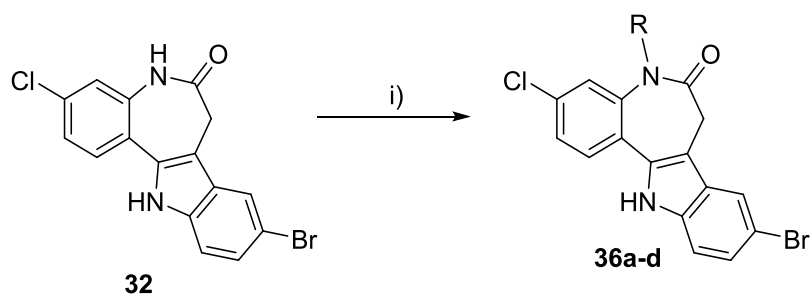
Das zyklische Keton **42** wurde anschließend in einer säurekatalysierten Fischer-Indol-Reaktion umgesetzt. Das Hydrazon **43** wurde unter Verwendung von 4-Bromphenylhydrazin Hydrochlorid in einer Lösung aus Natriumacetat und Eisessig hergestellt. **43** wurde ohne weitere Aufarbeitungsschritte direkt durch Zugabe von Schwefelsäure zum 3-Chlorkenpaullon (**32**) umgesetzt (Schema 4-4). Als Grundlage für die durchgeführte Fischer-Indol-Synthese wurde auf eine Vorschrift von KUNICK<sup>72</sup> zurückgegriffen.



Schema 4-4: Fischer-Indol-Synthese des 3-Chlorkenpavillons (**32**). Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeute: i) Eisessig, 4-Bromphenylhydrazin Hydrochlorid, NaOAc, 70 °C, 1 h; ii) Eisessig, konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 70 °C, 1 h, 41–73%.

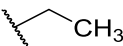
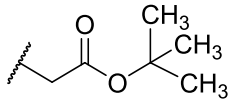
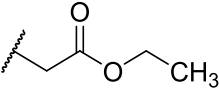
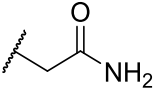
## 4.2 Selektive Substitution am N<sup>5</sup> des 3-Chlorkenpavillons

Ausgehend vom 3-Chlorkenpavillon (**32**) wurde die selektive Substitution des Lactamstickstoffs N<sup>5</sup> angestrebt. Die geplante Synthese erfolgte analog zu einer Vorschrift von KORN<sup>82</sup>, bei der der Einsatz von Kalium-*tert*-butylat in getrocknetem Tetrahydrofuran zu den gewünschten N<sup>5</sup>-substituierten Pavillonon **36a-d** führte. Für die Substitutionsreaktion am N<sup>5</sup> wurden die entsprechenden Halogenalkane als Reaktionspartner verwendet. Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen (Schema 4-5) konnten die Zielstrukturen **36a-d** (Tabelle 4-1) hergestellt werden.



Schema 4-5: Selektive Substitution am N<sup>5</sup> des 3-Chlorkenpavillons (**32**). Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeuten: i) 1. THF, KO<sup>t</sup>Bu, RT, N<sub>2</sub>, 1 h; 2. Halogenalkan, RT, N<sub>2</sub>, 22 h, 3–68%.

Tabelle 4-1: Synthetisierte  $N^6$ -substituierte Paullone.

Verb.	R	Verb.	R
<b>36a</b>		<b>36c</b>	
<b>36b</b>		<b>36d</b>	

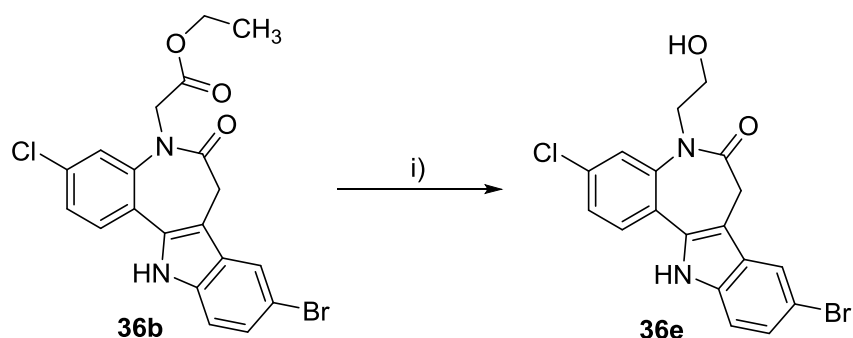
Damit die Verbindung **36d** für nachfolgende Versuche in ausreichender Menge zur Verfügung stand, wurde die präparative Darstellung der Verbindung durch Variation der Reaktionsbedingungen optimiert. Die Tabelle 4-2 zeigt verschiedene Reaktionsbedingungen und Ausbeuten bei der Synthese von **36d**. So wurde die Base Kalium-*tert*-butylat gegen Natriumhydrid ausgetauscht. Anschließend wurde der Reaktionsansatz unter Verwendung eines Metallkühlers zum Reflux erhitzt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels TLC auf vollständige Umsetzung kontrolliert und sukzessiv 2-Bromacetamid zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Nachdem kein unsubstituiertes 3-Chlorkenpaullon (**32**) mehr nachweisbar war, wurde der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und durch vorsichtige Zugabe von Wasser abgebrochen. Der Ansatz wurde anschließend durch Extraktion und Säulenchromatographie aufgearbeitet. Nach dieser abgewandelten Synthesevorschrift von SCHULTZ *et al.*<sup>106</sup> konnte die Ausbeute deutlich erhöht und die Reaktionszeit verkürzt werden. Nachteilig bei dieser Methode ist die Verwendung von Natriumhydrid als Base. Durch Reaktion mit Wasser kann explosiver Wasserstoff entstehen, sodass bei der Synthese Vorsicht geboten ist.

Tabelle 4-2: Vergleich von zwei Methoden zur Synthese der Verbindung **36d**.

<b>32</b>	<b>2-Brom-acetamid</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Base</b>	<b>Temp.</b>	<b>Reaktionszeit</b>	<b>Ausbeute</b>
1.03 mmol	1.80 mmol	THF	KO <sup>t</sup> Bu	RT	15 h	3%
0.451 mmol	1.81 mmol	THF	NaH	Reflux	7 h	35%

#### 4.2.1 Synthese von 9-Brom-3-chlor-5-(2-hydroxyethyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (36e)

Ausgehend von Verbindung **36b** wurde eine Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid in getrocknetem Tetrahydrofuran durchgeführt, um den Carbonsäureester zum primären Alkohol zu reduzieren (Schema 4-6). Obwohl bei dieser Reaktion diverse Nebenprodukte entstanden, konnte das gewünschte Produkt **36e** durch säulenchromatographische Aufreinigung isoliert werden. Die Synthese basiert auf einer modifizierten Vorschrift von SCHULZ.<sup>106</sup>

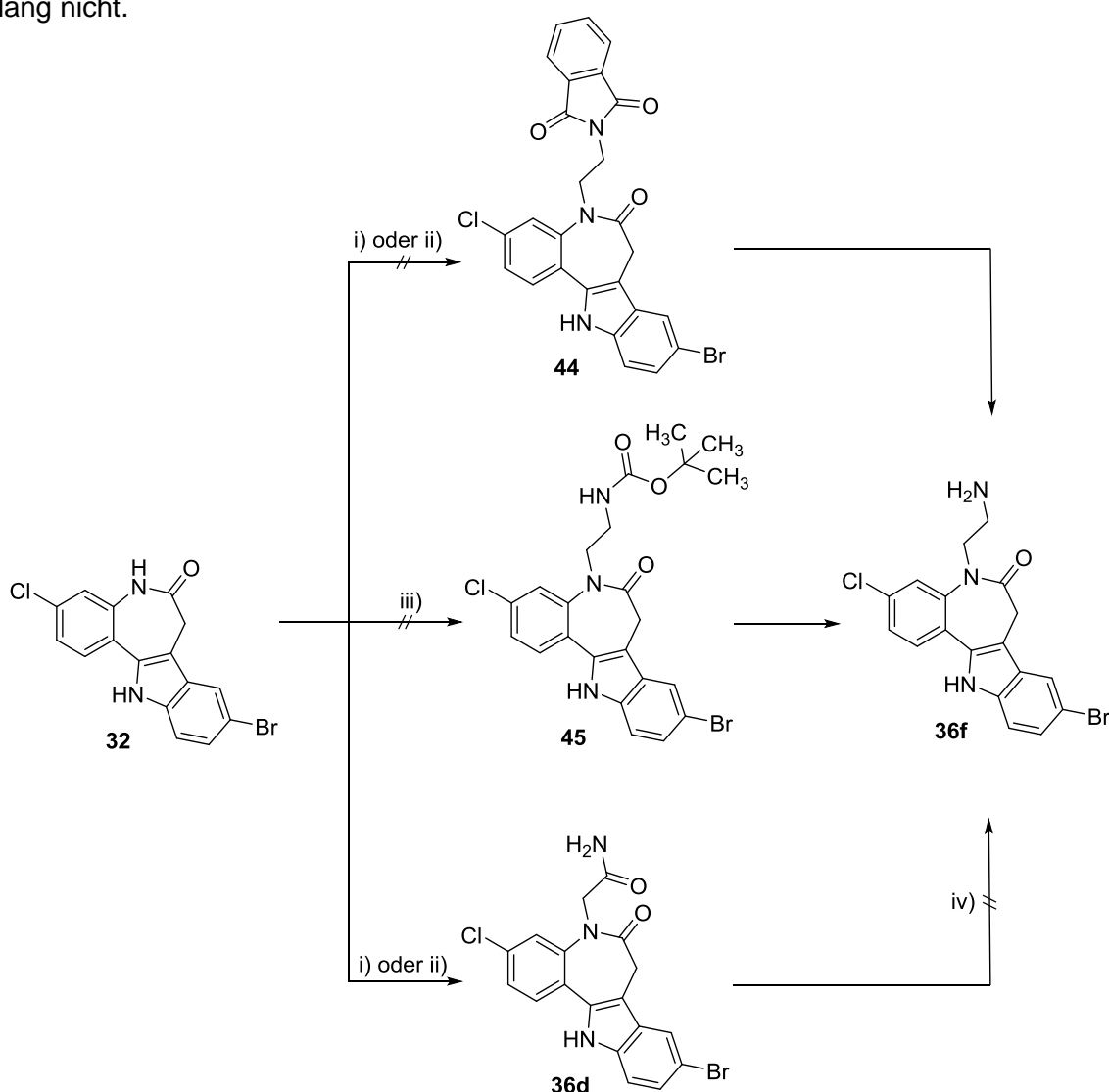


Schema 4-6: Präparative Darstellung von 9-Brom-3-chlor-5-(2-hydroxyethyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**36e**) durch Reduktion mit  $\text{LiAlH}_4$ . Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeute: i) 1. THF,  $\text{LiAlH}_4$ , Reflux, 10 h; 2.  $\text{H}_2\text{O}$ , 7%.

#### 4.2.2 Versuche zur Synthese von 5-(2-Aminoethyl)-9-brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (36f)

Als weiteres Teilprojekt der Arbeit wurde die Synthese der Struktur **36f** angestrebt (Schema 4-7), da vorangegangene *docking*-Untersuchungen starke Wechselwirkungen des terminalen Amins am  $N^6$  mit dem Zielenzym vorhergesagt hatten. Zunächst wurde die Einführung der geschützten Aminoethylgruppe am 3-Chlorlorkenpaullon (**32**) durch eine selektive nukleophile Substitution in getrocknetem Tetrahydrofuran mit den Hilfsbasen Natriumhydrid oder Kalium-*tert*-butylat angestrebt. Die Aminogruppe wurde bei diesen Versuchen durch eine Boc-Gruppe oder in Form einer Phthalimid-Gruppe geschützt. Versuche, die Aminoethyl-Seitenkette durch eine Substitutionsreaktion am Paullon **32** einzuführen, blieben jedoch erfolglos. Unter den gewählten Bedingungen kam es zu keiner

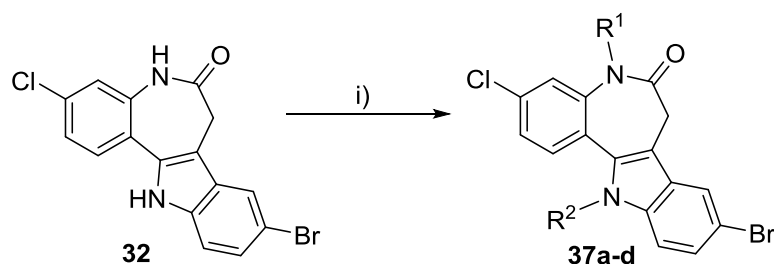
Umsetzung von **32** mit den verwendeten Bromalkanen zu den Synthesezwischenprodukten **44** oder **45**. Als Alternativsynthese wurde versucht, Verbindung **36d** mit Hilfe von Lithiumaluminiumhydrid zur Zielstruktur **36f** zu reduzieren. Das Paullon **36d** wurde durch Reaktion der Verbindung **32** mit 2-Bromacetamid in getrocknetem Tetrahydrofuran mit Natriumhydrid oder Kalium-*tert*-butylat unter den oben beschriebenen Bedingungen (vgl. Kapitel 4.2) synthetisiert. Der anschließende Reduktionsversuch wurde in siedendem getrocknetem Tetrahydrofuran durchgeführt. Dabei kam es zur Entstehung diverser Nebenprodukte, die starke blaue Fluoreszenz bei 254 nm zeigten und bei der Säulenchromatographie mit Kieselgel und Ethylacetat ihre Farbe von gelb zu violett und braun änderten. Eine Isolierung des gewünschten Produktes mittels Säulenchromatographie gelang nicht.



Schema 4-7: Versuche zur Synthese der Verbindung **36f**. Reaktionsbedingungen und Reagenzien: i) THF, KO<sup>t</sup>Bu, *N*-(2-Bromomethyl)phthalimid oder 2-Bromacetamid, RT, N<sub>2</sub>; ii) THF, NaH, *N*-(2-Bromomethyl)phthalimid oder 2-Bromacetamid, Reflux; iii) THF, NaH, *tert*-Butyl(2-bromomethyl)carbamate, Reflux; iv) 1. THF, LiAlH<sub>4</sub>, Reflux; 2. H<sub>2</sub>O.

### 4.3 Selektive Substitution am $N^{12}$ des 3-Chlorkenpaullons

Neben der selektiven Alkylierung am  $N^6$  zielten weiterführende Experimente auf die Einführung von Substituenten an der Position 12 des 3-Chlorkenpaullons (**32**) ab. Wichtig für die Regioselektivität dieser angestrebten nukleophilen Substitutionsreaktion am gesättigten Kohlenstoffatom ist die Wahl des Lösungsmittels. So führte der Wechsel des Reaktionsmediums von getrocknetem Tetrahydrofuran zu getrocknetem Aceton und die Verwendung von Kaliumhydroxid statt Kalium-*tert*-butylat als Base zu der gewünschten selektiven Substitution am Indolstickstoff-Atom (Schema 4-8). Diese Reaktionsbedingungen basierten auf einer Vorschrift von SCHULTZ<sup>106</sup>. Bei den durchgeführten Experimenten zur selektiven Alkylierung am Indolstickstoff-Atom wurden neben den gewünschten Produkten auch dialkylierte Nebenprodukte isoliert und vollständig charakterisiert.



Schema 4-8: Synthese zur selektiven Substitution am  $N^{12}$  des 3-Chlorkenpaullons (**32**). Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeuten: i) Aceton, KOH, Halogenalkan, RT, über Nacht, 2–13%.

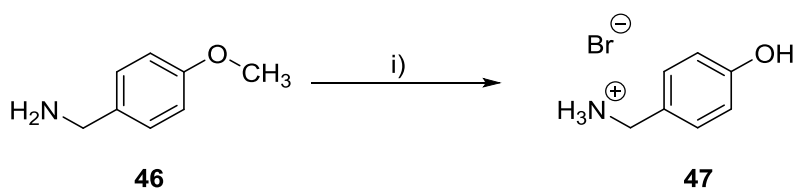
Tabelle 4-3: Verschieden substituierte 3-Chlorkenpaullone **37a–d**.

Verb.	$R^1$	$R^2$
<b>37a</b>	H	
<b>37b</b>		
<b>37c</b>	H	
<b>37d</b>		

## 4.4 Paullon-*N*<sup>5</sup>-acetamide

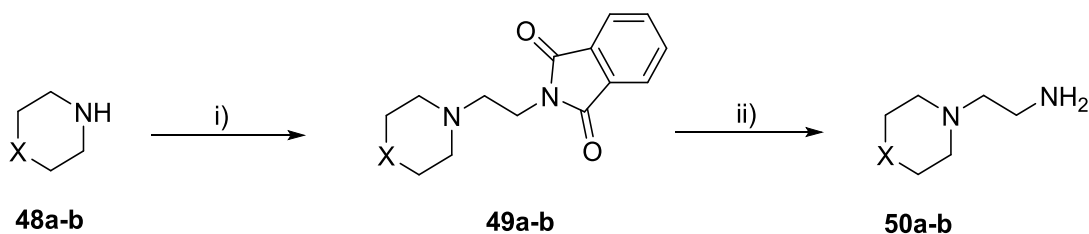
### 4.4.1 Präparative Darstellung von Aminen zur Synthese

Die für die Endstufensynthese der neuen Paullon-*N*<sup>5</sup>-acetamide benötigten Amine wurden entweder kommerziell erworben oder aus verfügbaren Vorstufen synthetisiert. So wurde ausgehend von 4-Methoxybenzylamin (**46**) durch eine saure Etherspaltung 4-Hydroxybenzylamin Hydrobromid (**47**) dargestellt, um dieses für die Synthese eines neuen *N*<sup>5</sup>-substituierten Paullons einzusetzen. Die Grundlage für diese weitere Synthese lieferte eine Vorschrift von STOUT *et al.*<sup>107</sup> Für die Etherspaltung wurde eine Lösung aus **46** und wässriger Bromwasserstoffsäure zum Rückfluss erhitzt (Schema 4-9). Das Reaktionsgemisch wurde auf dem Eisbad abgekühlt und der dabei entstandene kristalline Niederschlag anschließend abgesaugt.



Schema 4-9: Synthese von 4-Hydroxybenzylamin Hydrobromid (**47**) durch eine saure Etherspaltung. Reaktionsbedingung, Reagenzien und Ausbeute: i) HBr (48%), 170 °C, 17 h, 72%.

Außerdem wurden zyklische aliphatische Amine, wie Piperidin (**48a**) und Morpholin (**48b**) in einer Gabriel-Synthese zunächst mit *N*-(2-Bromethyl)phthalimid zu den Verbindungen **49a-b** umgesetzt.

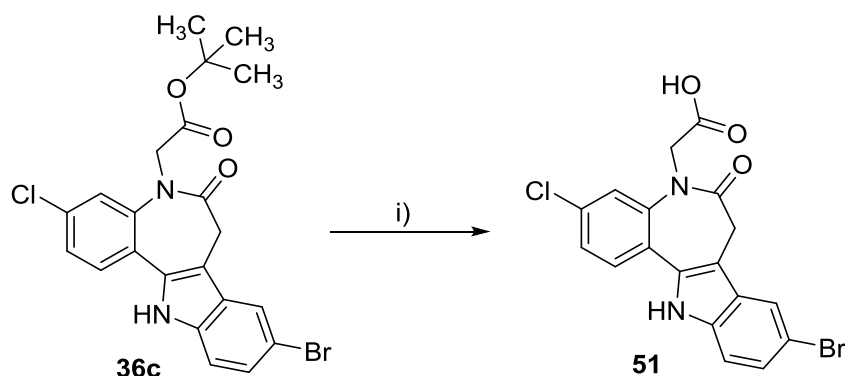


Schema 4-10: Gabriel-Synthese primärer aliphatischer Amine **50a-b**. Für **48a**, **49a** und **50a** X = CH<sub>2</sub>, für **48b**, **49b** und **50b** X = O. Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeuten: i) Acetonitril, *N*-(2-Bromethyl)phthalimid, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 100 °C, 4 h, Ausbeute **49a** (22%), **49b** (49%); ii) Ethanol, Hydrazin-Monohydrat, Reflux, 1 h, quantitative Ausbeuten.

Die anschließende Hydrazinolyse mit Hydrazin-Monohydrat in Ethanol unter Rückfluss lieferte die Produkte **50a–b** (Schema 4-10), wobei die Verbindungen ohne Aufarbeitungsschritte als Rohprodukte für weitere Synthesen eingesetzt wurden. Diese zweistufige Synthese-Sequenz wurde nach einer Vorschrift von JO *et al.*<sup>108</sup> durchgeführt.

#### 4.4.2 Präparative Darstellung von Paullon-*N*<sup>5</sup>-acetamiden

Für die angestrebte Synthese von Paullon-*N*<sup>5</sup>-acetamiden, die durch eine Amidkupplung erfolgen sollte, wurde zunächst ausgehend vom *N*<sup>5</sup>-substituierten Paullon **36c** nach einer Vorschrift von KORN<sup>109</sup>, die Paullon-*N*<sup>5</sup>-carbonsäure **51** synthetisiert. Dazu wurde die Verbindung **36c** in getrocknetem Dichlormethan suspendiert und mit Trifluoressigsäure versetzt. Der *tert*-Butylester wurde unter diesen Bedingungen gespalten und die freie Säure **51** konnte isoliert werden (Schema 4-11).

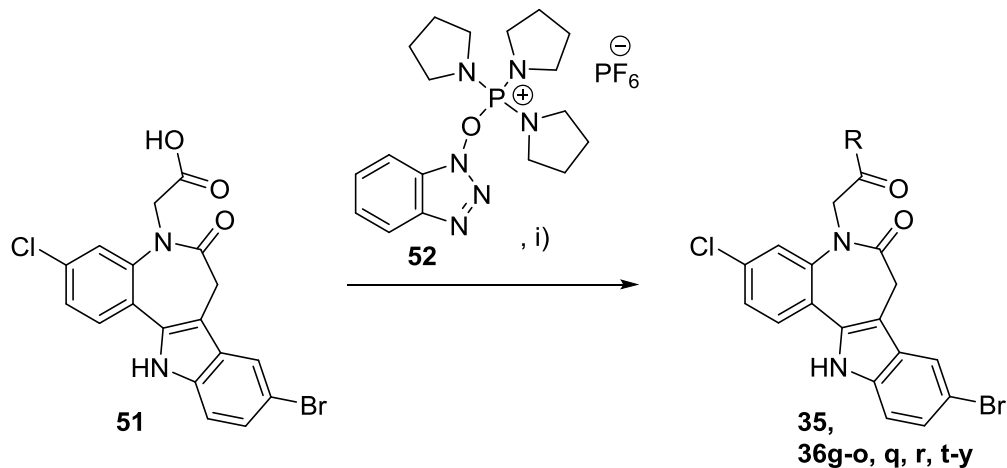


Schema 4-11: Spaltung des *tert*-Butylesters hin zur Paullon-*N*<sup>5</sup>-essigsäure (**51**). Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeute: i) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TFA, RT, N<sub>2</sub>, 22 h, 90%-quantitative Ausbeute.

Für die präparative Darstellung von Paullon-*N*<sup>5</sup>-acetamiden aus der entsprechenden Paullon-*N*<sup>5</sup>-essigsäure (**51**) wurde eine Amidkupplung in DMF mit dem Kupplungsreagenz PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat, **52**) unter Verwendung der Hilfsbase DIPEA angestrebt (Schema 4-12, Tabelle 4-4 und Tabelle 4-5). **52** ist eine von COSTE *et al.* beschriebene Weiterentwicklung des Kupplungsreagenzes BOP, bei dem Dimethylamino-Gruppen gegen Pyrrolidin-Substituenten ausgetauscht wurden. Durch den Austausch wird die Entstehung des kanzerogenen Hexamethylphosphorsäuretriamids als Abgangsgruppe vermieden.<sup>110</sup> Die Aktivierung der Carbonsäure erfolgt analog zur Reaktion



von BOP mit Carbonsäurederivaten über die Bildung eines Benzotriazol-Aktivesters. Dieses reaktive Intermediat wird anschließend mit den entsprechenden Aminen zu den neuen Paullon-*N*<sup>5</sup>-acetamiden umgesetzt.<sup>111</sup> Die Synthese erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von KORN<sup>112</sup>, die sich dabei auf eine Patentschrift von STUHLMANN *et al.*<sup>78</sup> bezieht.



Schema 4-12: Amidsynthese von neuen Paullon-*N*<sup>5</sup>-acetamiden durch eine Amidkupplung unter Standardbedingungen. Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeuten: i) DMF, DIPEA, Amin, 0 °→RT, Argon, 20 h, 6–70%.

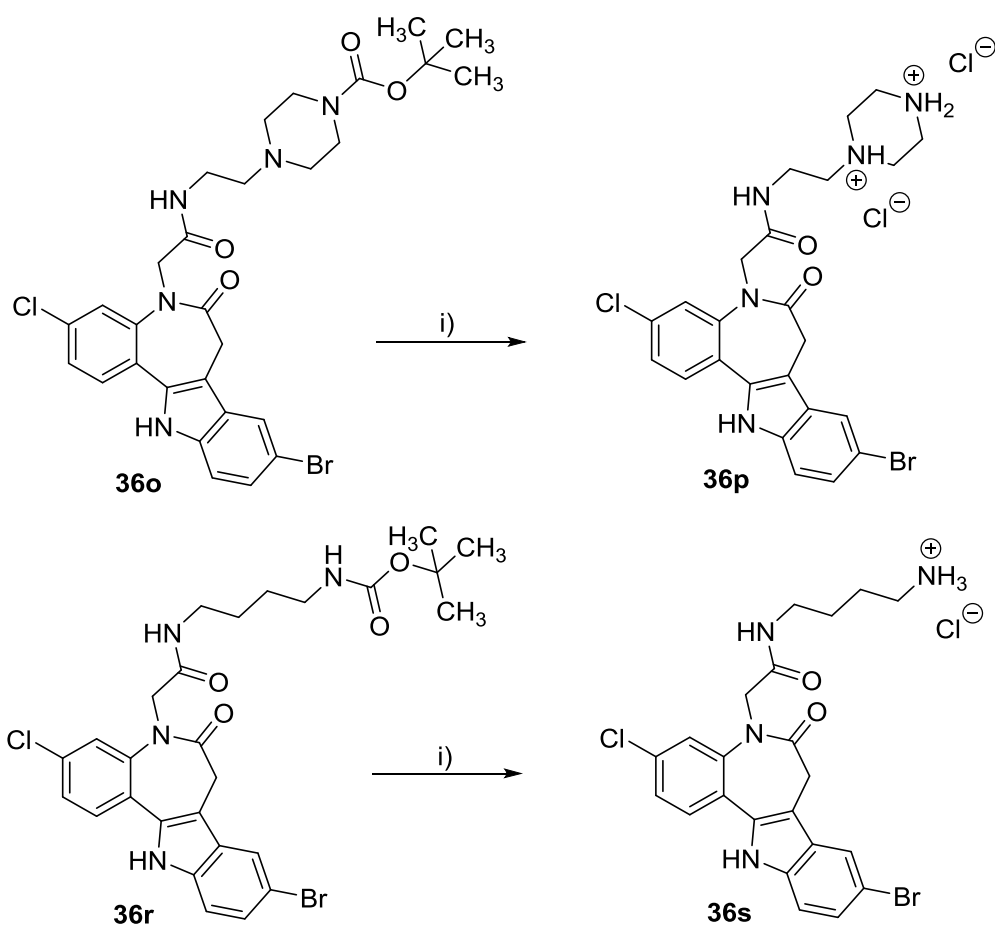
Tabelle 4-4: Durch Amidkupplung synthetisierte Paullon-*N*<sup>5</sup>-acetamide **35**.

Verb.	R	Verb.	R	Verb.	R
35a		35e		35i	
35b		35f		35j	
35c		35g		35k	
35d		35h			

Tabelle 4-5: Durch Amidkupplung synthetisierte Paullon-*N*<sup>5</sup>-acetamide **36**.

Verb.	R	Verb.	R	Verb.	R
<b>36g</b>		<b>36m</b>		<b>36u</b>	
<b>36h</b>		<b>36n</b>		<b>36v</b>	
<b>36i</b>		<b>36o</b>		<b>36w</b>	
<b>36j</b>		<b>36q</b>		<b>36x</b>	
<b>36k</b>		<b>36r</b>		<b>36y</b>	
<b>36l</b>		<b>36t</b>			

Im Fall der Verbindungen **36o** und **36r** wurden nach der Amidkupplung die Boc-Schutzgruppen abgespalten (Schema 4-13). Die Synthese wurde in Dichlormethan unter Verwendung von Trifluoressigsäure durchgeführt. Die Isolierung der Produkte erfolgte durch eine Hydrochloridfällung in Diethylether. Für die Boc-Spaltung und die Fällung der Produkte als Salze wurde eine modifizierte Synthesevorschrift von KORN<sup>109</sup> verwendet.

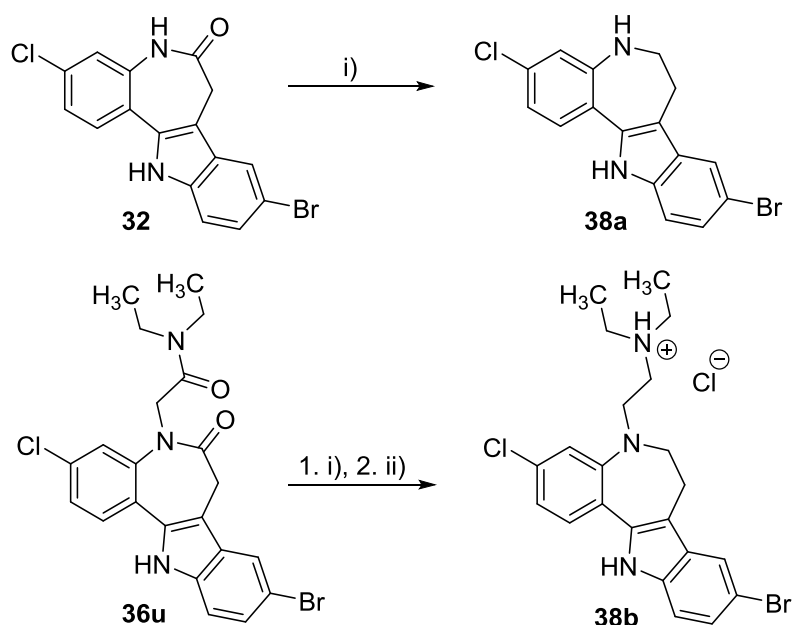


Schema 4-13: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und Isolierung der erhaltenen Produkte als Hydrochloride **36p** und **36s**. Reaktionsbedingungen und Reagenzien: i) 1.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , TFA, RT,  $\text{N}_2$ , 24 h; 2. Propan-2-ol, HCl; Ausbeute **36p** (47%), **36s** (94%).

## 4.5 Versuche zur Reduktion von Paullonen mit Lithiumaluminiumhydrid

In einem Teilprojekt wurde die Entstehung von Nebenprodukten bei der Reduktion von Verbindung **36d** mit Lithiumaluminiumhydrid näher untersucht. Der Versuch der Reduktion des terminalen Amids am  $\text{N}^6$  wurde bereits in Kapitel 4.2.2 diskutiert. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass sekundäre und tertiäre Amide zu den entsprechenden sekundären und tertiären Aminen reduziert werden.<sup>113, 114</sup> Primäre Amide scheinen weniger reduktionsempfindlich zu sein und reagieren langsamer.<sup>115</sup> So ist anzunehmen, dass bevorzugt das Lactam des Azepin-Rings der Verbindung **36d** zum tertiären Amin reduziert wird. Um diese

Überlegung zu stützen, wurde unter ähnlichen Reaktionsbedingungen (getrocknetes Tetrahydrofuran als Lösungsmittel, Lithiumaluminiumhydrid im Überschuss, Reflux) zunächst das unsubstituierte 3-Chlorkenpaullon (**32**) reduziert (Schema 4-14). Dünnschichtchromatographisch zeigte sich dabei eine vollständige Umsetzung des Edukts zum gewünschten Produkt **38a**, welches vollständig charakterisiert wurde. Weiterführend wurde auch die Verbindung **36u** mit Lithiumaluminiumhydrid zur Verbindung **38b** reduziert. Die Isolierung des Produktes gelang über eine Hydrochloridfällung in Diethylether. Bei dem isolierten Produkt konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das Lactam als auch das tertiäre Amid zu tertiären Aminen reduziert wurde. Die durchgeführten Experimente bestätigen somit die Reduktionsempfindlichkeit tertiärer Amide und Lactame.



Schema 4-14: Reduktion von Paullonen mit  $\text{LiAlH}_4$  zu den Verbindungen **38a** und **38b**. Reaktionsbedingungen und Reagenzien: i) 1. THF,  $\text{LiAlH}_4$ , Reflux; 2.  $\text{H}_2\text{O}$ ; ii) Propan-2-ol,  $\text{HCl}$ ; Ausbeute **53** (42%), **54** (26%).

## 4.6 NMR-spektrometrische Besonderheiten *N*-substituierter Paullone

Das 3-Chlorkenpaullon (**32**) zeigt im  $^1\text{H}$ -Spektrum (Abbildung 4-2) neben den beiden tieffeldverschobenen Signalen des Indol-Protons und des Lactam-Protons Signale, die den aromatischen Protonen zugeordnet werden können. Ein Singulett bei 3.56 ppm wird durch die Azepin-Methylen-Protonen verursacht. Diese Methylen-Protonen stellen dabei eine enantiotope Gruppe dar. Durch schnelle Ringinversion am Azepin-Ring des unsubstituierten 3-Chlorkenpaullons werden die Azepin-Methylen-Protonen chemisch äquivalent, wodurch nur ein Signal zu erkennen ist.<sup>116, 117</sup> Bei Temperaturniedrigung würde man zunächst ein breiteres und bei tieferen Temperaturen zwei breite Signale erwarten. Bei sehr tiefen Temperaturen würde die Ringinversion so stark verlangsamt ablaufen, dass die Kopplung der beiden Kerne sichtbar wird, woraus im Spektrum ein AB-System resultiert.<sup>117</sup>

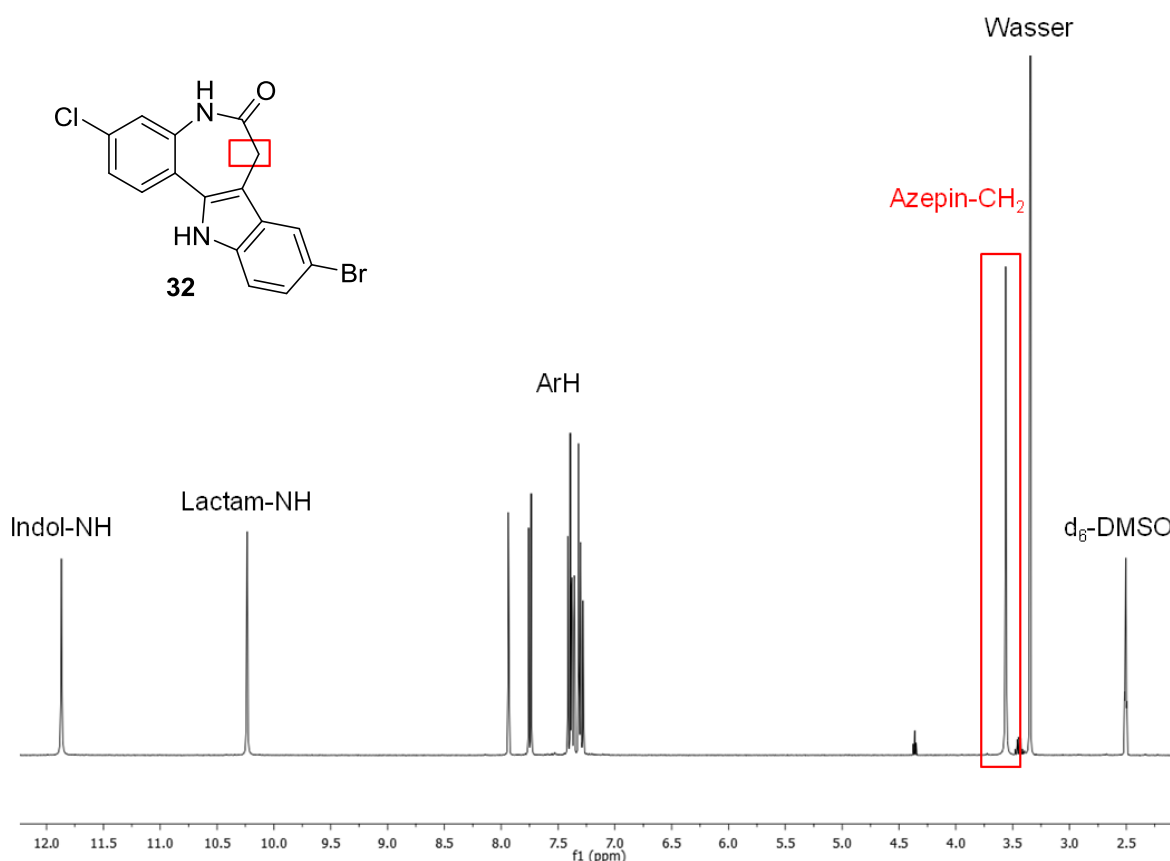


Abbildung 4-2:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **32**.

Beispielhaft für die NMR-spektrometrisch vermessenen neuen Paullon- $N^5$ -acetamide werden im Folgenden die NMR-Spektren der Verbindung **35a** (Abbildungen 4-3 bis 4-5) diskutiert. Bei den Azepin-Methylen-Protonen von **35a** wird, aufgrund einer erhöhten Energiebarriere für den Konformationswechsel am Ring und der daraus resultierenden eingeschränkten Dynamik, die Anisochronie im Spektrum bei 30.15 °C sichtbar. Die erhöhte Energiebarriere wird durch den Substituenten am  $N^5$  verursacht und führt zu einer verlangsamten Ringinversion. Für die beiden chemisch inäquivalenten Azepin-Methylen-Protonen von **35a** wurden zwei sehr breite Signale wiedergefunden, die durch eine Messung nahe der Koaleszenztemperatur zustande kommen. Bei niedrigeren Temperaturen wäre die intramolekulare Dynamik noch stärker eingeschränkt, sodass zwei Dubletts zu erwarten gewesen wären.<sup>116, 117</sup> Für die  $N^5$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe und die CH<sub>2</sub>-Gruppe des Benzylamids findet man ein intensives breites Signal, welches für eine Messung nahe der Koaleszenztemperatur typisch ist und zudem aus einer Überlappung beider Signale entsteht. Die Protonen dieser beiden Methylenprotonen sind jeweils diastereotop. Durch die eingeschränkte Ringinversion am Azepinring resultiert Anisochronie, wodurch die diastereotopen Protonen anisochron werden, was dann zu den beobachteten Effekten führt.<sup>117</sup>

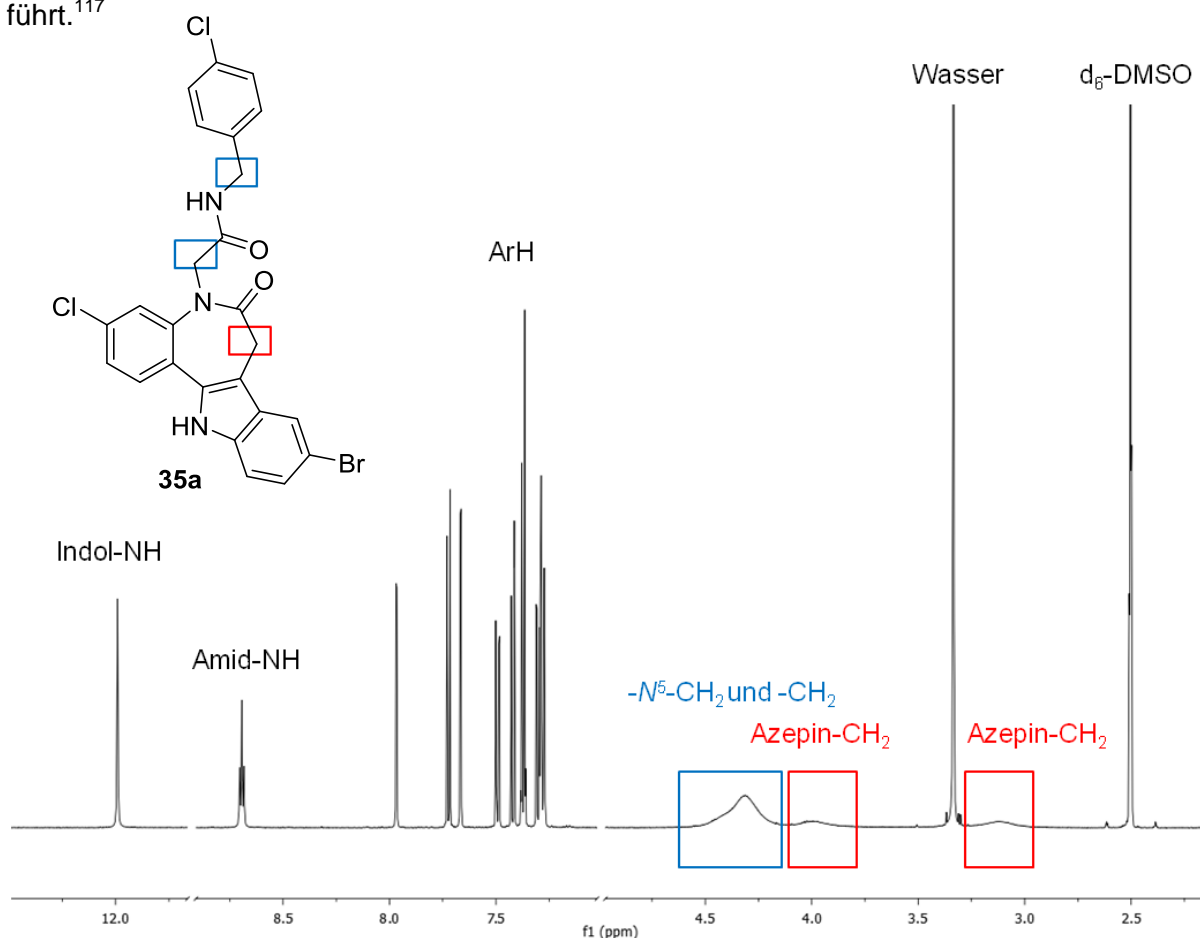


Abbildung 4-3: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung **35a** stellvertretend für neue Paullon- $N^5$ -acetamide.

Zudem wurden anhand des H,C-HSQC-Spektrums der Verbindung **35a** die Signale der Azepin-Methylen-Protonen, der  $N^{\delta}$ -CH<sub>2</sub>- und der CH<sub>2</sub>-Gruppe der Benzylamid-Partialstruktur im <sup>1</sup>H-Spektrum den Signalen im <sup>13</sup>C-Spektrum zugeordnet. Die  $N^{\delta}$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe erfährt durch die beiden angrenzenden funktionellen Gruppen einen stärkeren Elektronenzug, sodass das Signal im <sup>13</sup>C-Spektrum stärker tieffeldverschoben ist als das Signal der CH<sub>2</sub>-Gruppe der Benzylamid-Partialstruktur. Das Signal der Azepin-CH<sub>2</sub>-Gruppe ist im Vergleich dazu hochfeldverschoben.

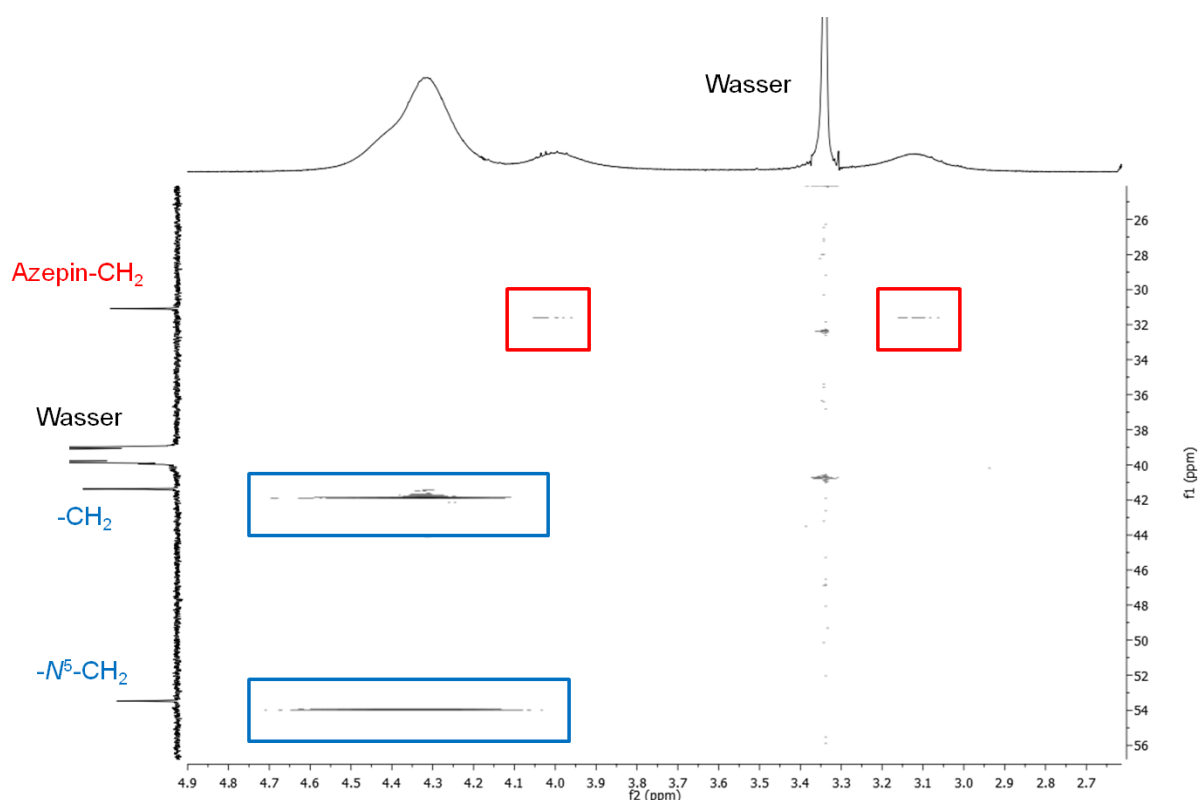


Abbildung 4-4: Ausschnitt aus dem H,C-HSQC-Spektrum der Verbindung **35a**.

Die Durchführung eines weiteren 2D-Experimentes (H,H-COSY) erlaubt die Zuordnung der Signale im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zu den aromatischen Protonen der Verbindung **35a**. Die Multipletts bei 7.39–7.35 und 7.29–7.26 ppm zeigen einen ausgeprägten Dacheffekt und können dem AA'XX'-System des *para*-substituierten Aromaten der  $N^{\delta}$ -Seitenkette zugeordnet werden. Das tieffeldverschobene Multiplett gehört zu den Protonen 3' und 5', da der *ortho*-ständige Chlor-Substituent durch Elektronenzug zu einer Entschirmung an den entsprechenden Kernen und damit zu einer Tieffeldverschiebung des Signals führt. Folglich wird das hochfeldverschobene Multiplett durch die Protonen 2' und 6' verursacht.

Aus dem Experiment ist ersichtlich, dass die Verbindung zwei  $A_1M_1X_1$ -Systeme enthält, die durch die Protonen des 3-Chlorkenpauillons hervorgerufen werden. So kann man zwei Dubletts mit großer Kopplungskonstante (1 und 6, A-Kerne), zwei Dubletts vom Dublett (2 und 5, M-Kerne) und zwei Dubletts mit kleiner Kopplungskonstante (3 und 4, X-Kerne) dem Spektrum entnehmen. Aufgrund der Kopplungskonstanten und mit Hilfe des H,H-COSY-Spektrums von **35a** lassen sich die Signale der Kerne von 1, 2 und 3 einem ersten  $A_1M_1X_1$ -System zuordnen. Die Signale der Kerne von 4, 5 und 6 werden durch ein zweites  $A_1M_1X_1$ -System verursacht. Eine Zuordnung der Signale zu den einzelnen Protonen des 3-Chlorkenpauillons war nicht möglich.

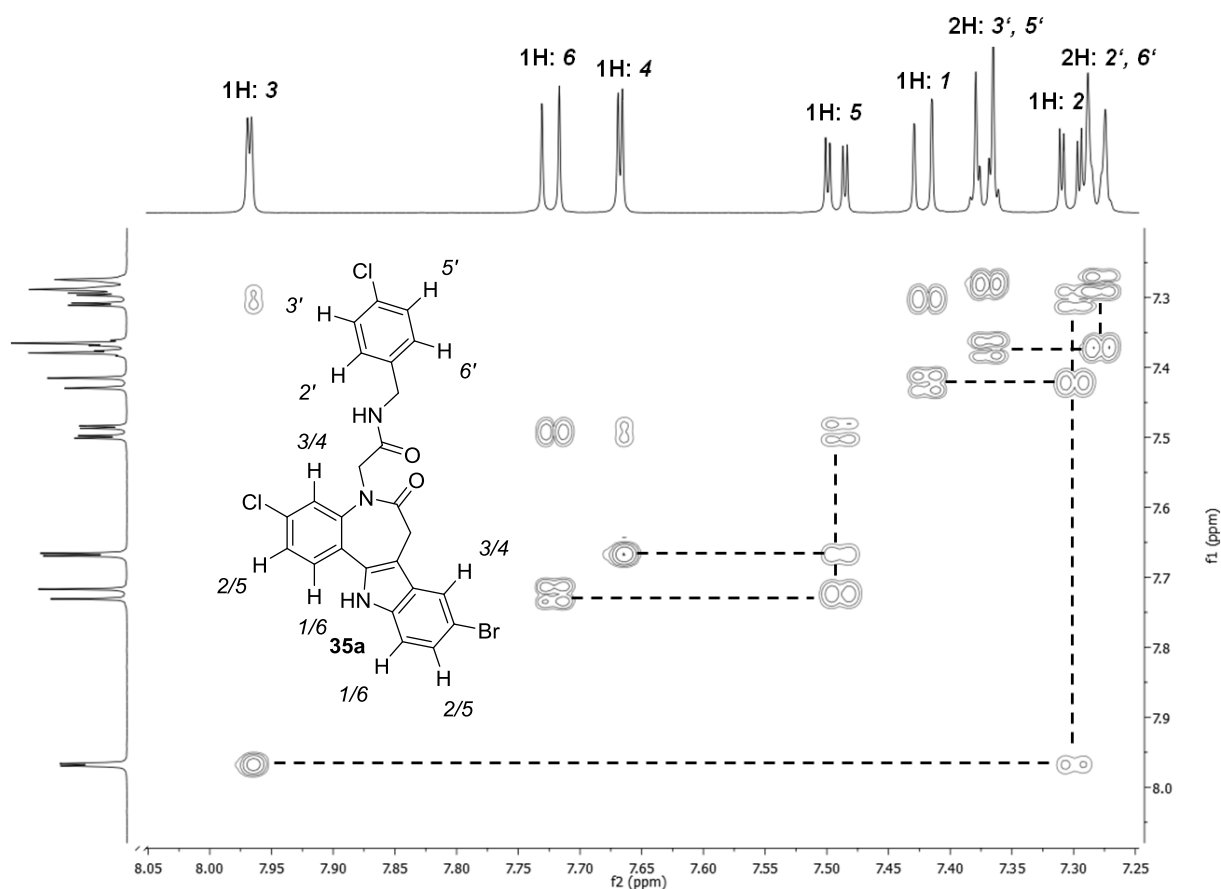


Abbildung 4-5: Ausschnitt aus dem H,H-COSY-Spektrum der Verbindung **35a**.

Auch bei dem  $N^{12}$ -substituierten Pauillon **37c** (Abbildung 4-6) konnten für die Azepin-Methylen-Protonen zwei breite Signale wiedergefunden werden, die durch eine Messung nahe der Koaleszenztemperatur zustande kommen. Im Gegensatz dazu sind die Protonen der Methylengruppe am  $N^{12}$  unter den Messbedingungen chemisch äquivalent und zeigen ein scharfes Singulett.



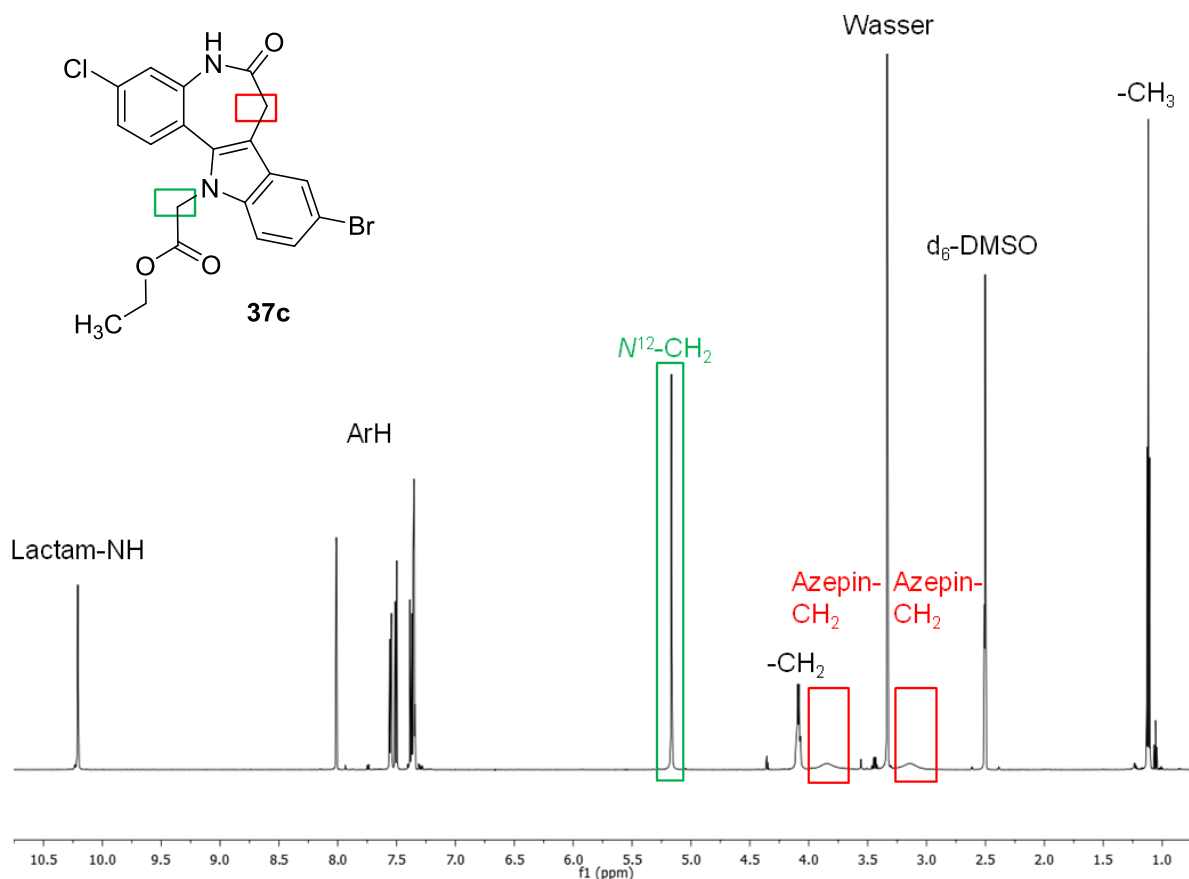


Abbildung 4-6:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des  $N^{12}$ -substituierten Paullons **37c**.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **37d** (Abbildung 4-7) zeigt Signale, die aromatischen oder aliphatischen Protonen zugeordnet werden können. Es fehlen dagegen Signale für die Protonen am Indol-Stickstoff und am Lactam-Stickstoff, was den Strukturvorschlag eines disubstituierten Paullons untermauert. Im Vergleich zu den bereits diskutierten  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren liefern sowohl die Azepin-Methylen-Protonen als auch die Methylen-Protonen am  $N^6$  und  $N^{12}$  jeweils zwei Dubletts als Signale. Die beiden Protonen der Methylengruppen sind jeweils chemisch nicht äquivalent, da unter den Messbedingungen die Ringinversion am Azepinring eingeschränkt ist.<sup>117</sup> Folglich bilden die Methylengruppen jeweils AB-Systeme. Die beiden Dubletts jeder der drei Methylen-Gruppen zeigen dabei erwartungsgemäß Dacheffekte, die bei eng zusammenstehenden Signalen, wie bei der  $N^6\text{-CH}_2$ - und  $N^{12}\text{-CH}_2$ -Gruppe, stärker ausgeprägt sind.

Eine ungewöhnliche Signalaufspaltung liefern die Protonen beider  $\text{CH}_2$ -Ethylester-Gruppen (Vergrößerung in Abbildung 4-7). Die zwei komplexen Signale können durch  $\text{ABX}_3$ -Systeme erklärt werden. Dabei lassen sich die Kerne A und B den Protonen der  $\text{CH}_2$ -Ethylester-Gruppen zuordnen. Die X-Kerne stellen die Protonen der  $\text{CH}_3$ -Gruppen dar. Die Protonen

der CH<sub>2</sub>-Ethylester-Gruppen verhalten sich bei der eingeschränkten Ringinversion ebenso wie die Methylengruppen am N<sup>6</sup> und N<sup>12</sup> diastereotop.<sup>118</sup>

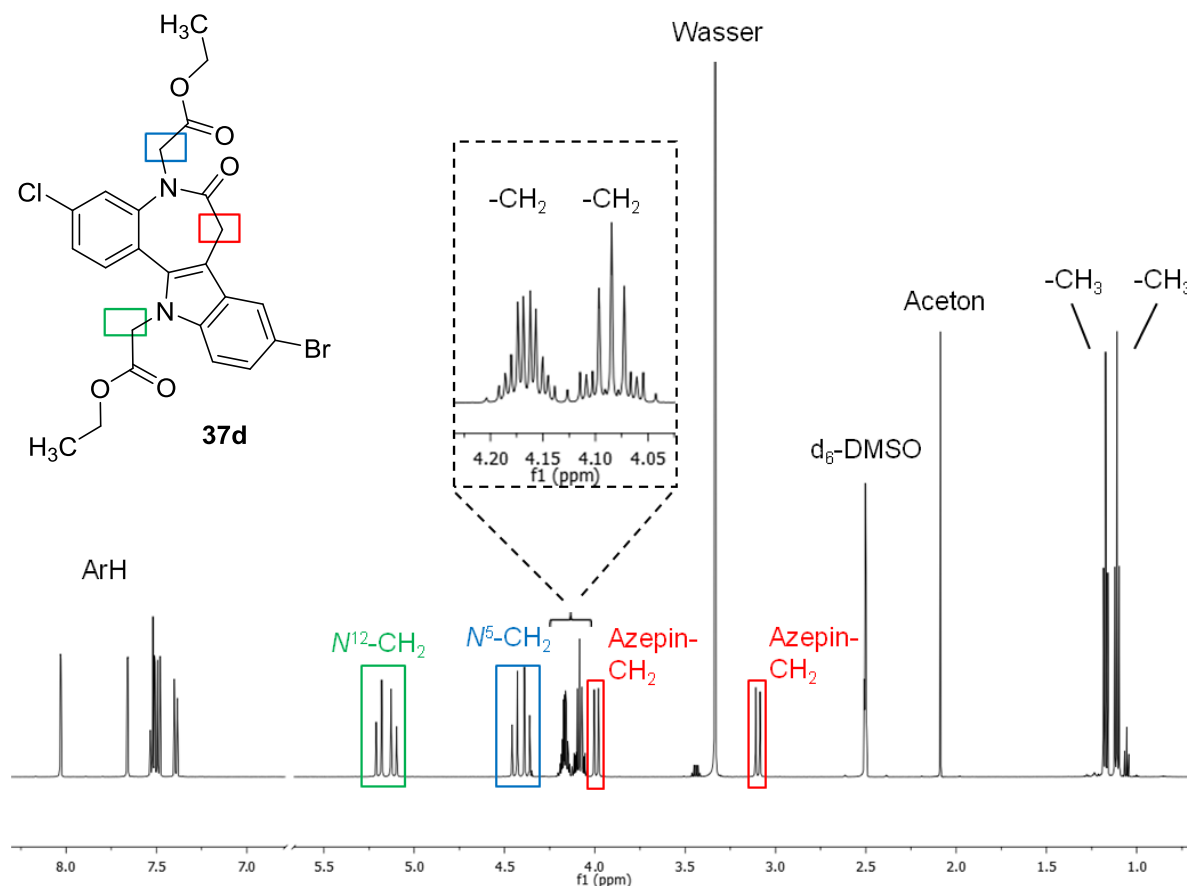


Abbildung 4-7: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der N<sup>6</sup>,N<sup>12</sup>-disubstituierten Verbindung **37d**.

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung **36w** (Abbildung 4-8) weist einige spektrale Besonderheiten auf. Scharfe Signale konnten dem Proton am Indol-Stickstoff und den aromatischen Protonen zugeordnet werden. Weiterhin konnten vier stark verbreiterte Signale den Methylen-Protonen am N<sup>6</sup> und den Azepin-Methylen-Protonen zugewiesen werden. Die starke Verbreiterung der Signale kommt durch eine Messung nahe der Koaleszenztemperatur zustande, die bereits erläutert wurde.<sup>117</sup> Die Ethylengruppe des Thiazolin-Substituenten liefert zwei Triplets, wobei das Triplett bei 3.67 ppm im Spektrum ebenfalls verbreitet erscheint. Ein weiteres breites Signal konnte bei 9.93 ppm beobachtet werden, das einem weiteren Heteroatom-gebundenem Proton zuzuordnen ist.

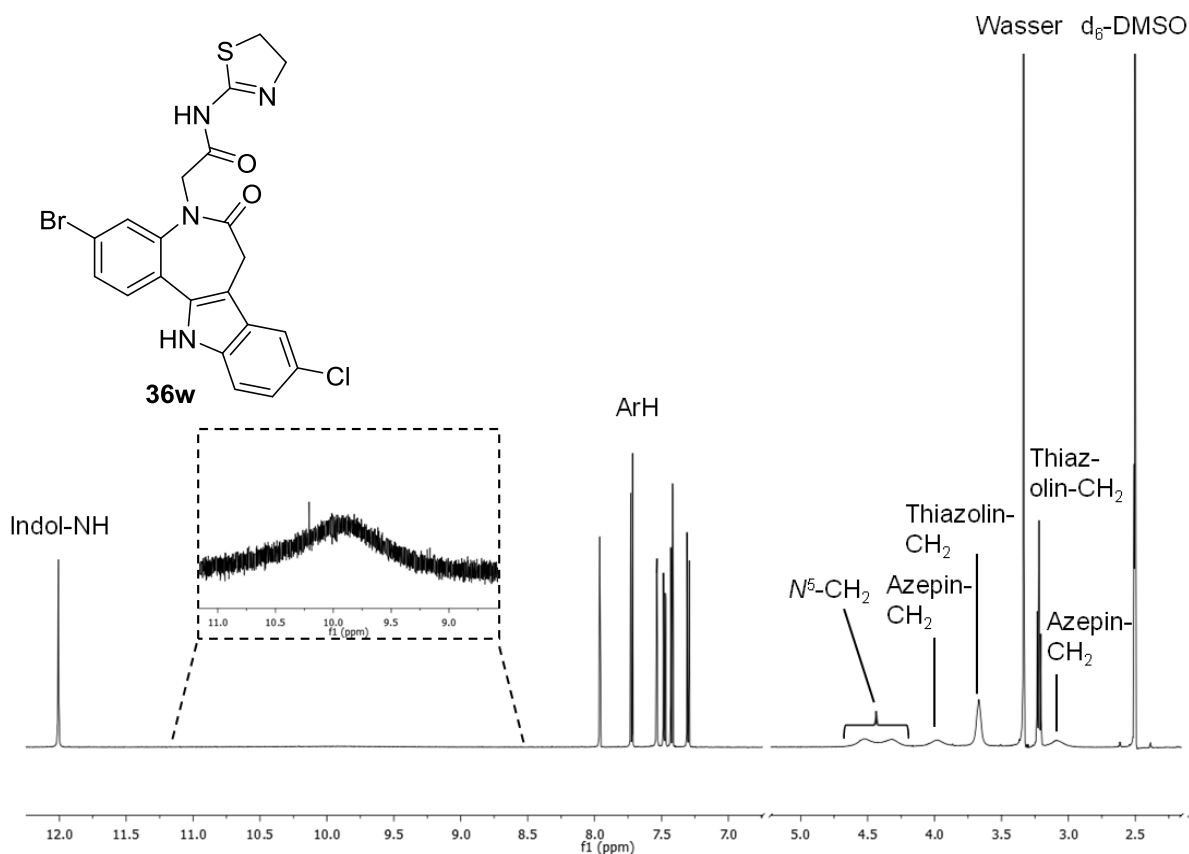


Abbildung 4-8:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **36w**, dargestellt als *N*-(Thiazolin-2-yl)amid. Die Signalverbreiterung bei 9.93 ppm wurde separat hervorgehoben.

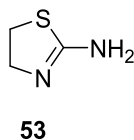


Abbildung 4-9: 4,5-Dihydro-1,3-thiazol-2-amin (**53**). Der Heterozyklus wurde für die Synthese von **36w** eingesetzt.

Die Verbindung **36w** wurde durch eine Reaktion von 4,5-Dihydro-1,3-thiazol-2-amin (**53**) mit dem Benzotriazol-Aktivester präparativ dargestellt. Die Verbindung **53** (Abbildung 4-9) stellt dabei einen umfangreich untersuchten Heterozyklus dar, der sich als ein gutes Nukleophil für die Darstellung von 2-Iminothiazolidinen eignet. So reagiert der Heterozyklus **53** mit Isocyanaten oder Isothiocyanaten bevorzugt über den zyklischen Stickstoff. Unter Erhitzen ist eine sich anschließende intramolekulare Umlagerung, hin zum thermodynamisch stabileren Produkt, möglich. Das thermodynamisch stabilere Produkt trägt dabei das ursprüngliche Elektrophil an der exozyklischen Aminogruppe. Auch eine Alkylierung von **53** am zyklischen Amin mit Iodalkanen wurde beobachtet.<sup>119</sup>

Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass bei der Reaktion von **53** mit reaktiven Carbonsäure-Derivaten, wie Carbonsäurechloriden, *N*-(Thiazolin-2-yl)amide entstehen. Hierbei kommt es zu einer Acylierung an der exozyklischen Aminogruppe.<sup>120, 121</sup> Da der Benzotriazol-Aktivester ebenfalls ein reaktives Carbonsäure-Derivat darstellt, wird eine Bildung vom *N*-(Thiazolin-2-yl)amid **36w** bei der Reaktion von **53** mit dem Aktivester als wahrscheinlich erachtet. Nach Substitution am primären Amin zeigen die Reaktionsprodukte wie **36w** die Tendenz, bevorzugt 2-Iminothiadiazolidin-Isomere durch Tautomerie auszubilden.<sup>119</sup> Das besonders breite Signal bei 9.93 ppm lässt sich folglich durch Tautomerie erklären,<sup>122</sup> die in Abbildung 4-10 dargestellt ist. Als tautomere Formen sind neben dem 2-Iminothiadiazolidin-Isomer **36w'** und dem 2-Thiazolin-Isomer **36w** auch ein Iminol-Tautomer **36w''** denkbar.

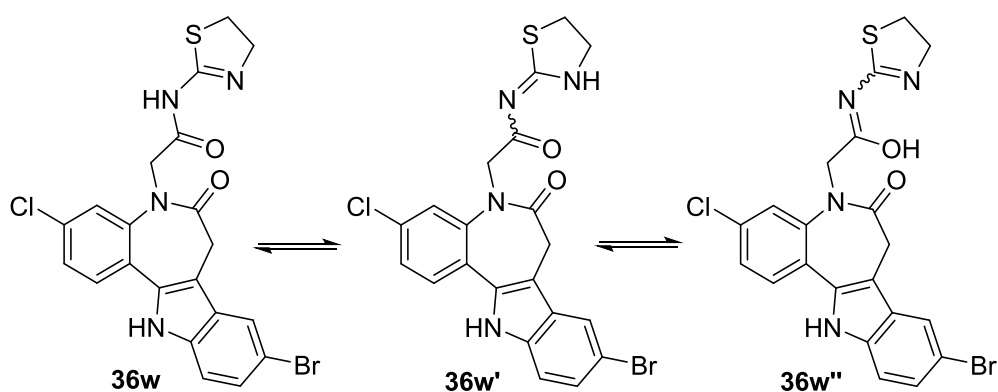


Abbildung 4-10: Tautomerie der Verbindung **36w**. Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass analoge Verbindungen überwiegend als 2-Iminothiadiazolidin-Isomere **36w'** vorliegen.<sup>119</sup> Auch die Bildung des Iminol-Tautomers **36w''** ist zu einem geringen Anteil möglich.

## 5. Biochemische und biologische Evaluierung

Die Evaluierung der hier vorgestellten neuen Paullone erfolgte zum Teil im Rahmen von kurzen Forschungsaufenthalten am Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. Die Untersuchungen wurden von mir in der von MARCELO COMINI geleiteten Forschungsgruppe *Laboratory Redox Biology of Trypanosomes* durchgeführt. Während der Aufenthalte wurden Experimente mit Parasiten (*T. brucei brucei*, *L. infantum*) und Zytotoxizitätsuntersuchungen mit murinen Makrophagen in Zusammenarbeit mit ANDREA MEDEIROS durchgeführt. Bei der Aufreinigung rekombinanter TryS wurde DIEGO BENÍTEZ assistiert. Die in diesem Zusammenhang gezeigten Abbildungen wurden von ihm zur Verfügung gestellt. Versuche zur Enzyminhibition mit neuen Paullonen wurden von DIEGO BENÍTEZ oder von mir selbst durchgeführt.

### 5.1 Proliferationsuntersuchungen und Durchflusszytometrie

Für die Proliferationsuntersuchung an *T. brucei brucei*-Parasiten der infektiösen Blutstromform, die nach einer modifizierten Vorschrift von MAIWALD *et al.*<sup>123</sup> und BENÍTEZ *et al.*<sup>80</sup> erfolgte, wurden die Parasitenkulturen durch tägliche Passagen in die Phase des exponentiellen Wachstums gebracht. In den Experimenten wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. So wurde sowohl *T. brucei brucei* vom Wildtyp 427, als auch eine gentechnisch veränderte Zelllinie (*T. brucei brucei* Stamm 427, Zelllinie 449 GFP) eingesetzt. Die gentechnisch veränderte Zelllinie 449 GFP ist zur Expression des Grünen Fluoreszenzproteins fähig. Die Hemmung der Proliferation wurde nach 24stündiger Inkubation unter Einwirkung der Testverbindungen bestimmt. Erwiesen sich die Verbindungen in einem ersten Screening bei 5  $\mu$ M als aktiv gegen *T. brucei brucei* (>50% Wachstumsinhibition) wurde in einem zweiten Schritt der EC<sub>50</sub>-Wert determiniert.

Für die Bestimmung der lebenden Parasiten nach der Inkubation wurde auf die Durchflusszytometrie zurückgegriffen. Bei dieser Methode werden die Zellen hydrodynamisch durch eine Messzelle geführt, wobei der Flux während der Messung konstant gehalten wird. Während der Passage werden die Zellen mit Laserlicht bestrahlt. Die Zellen, die in 60 Sekunden die Messzelle passieren, werden dabei einzeln erfasst. Das von den Zellen gestreute Licht wird als Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC, FS) und als seitliche Streuung (*side scatter*, SC, SS) detektiert, wobei der Grad der Streuung unter anderem abhängig von der Größe und der Granularität der Zellen ist. Da sich tote und sterbende Parasiten zusammenziehen und runde Formen bilden, verändert sich der Grad

der Streuung des Lichtes und macht eine Unterscheidung von lebenden Parasiten möglich. Im Fall von *T. brucei brucei* 449 GFP wurden tote Parasiten vor der Bestimmung durch Zusatz von Propidiumiodid markiert. Wie in Abbildung 5-1 dargestellt, wurde für die Auswertung die Vorwärtsstreuung und die seitliche Streuung logarithmisch gegeneinander aufgetragen. Mit Hilfe von Kontrollen wurden Bereiche aufgestellt, die lebende Zellen von toten Zellen und vorhandenem Detritus abgrenzen. So konnte die lebende Population nach erfolgter Inkubation ermittelt werden. Unter Bezug auf die Positivkontrolle (DMSO) wurde die Hemmung der Proliferation durch die Testverbindung beurteilt.

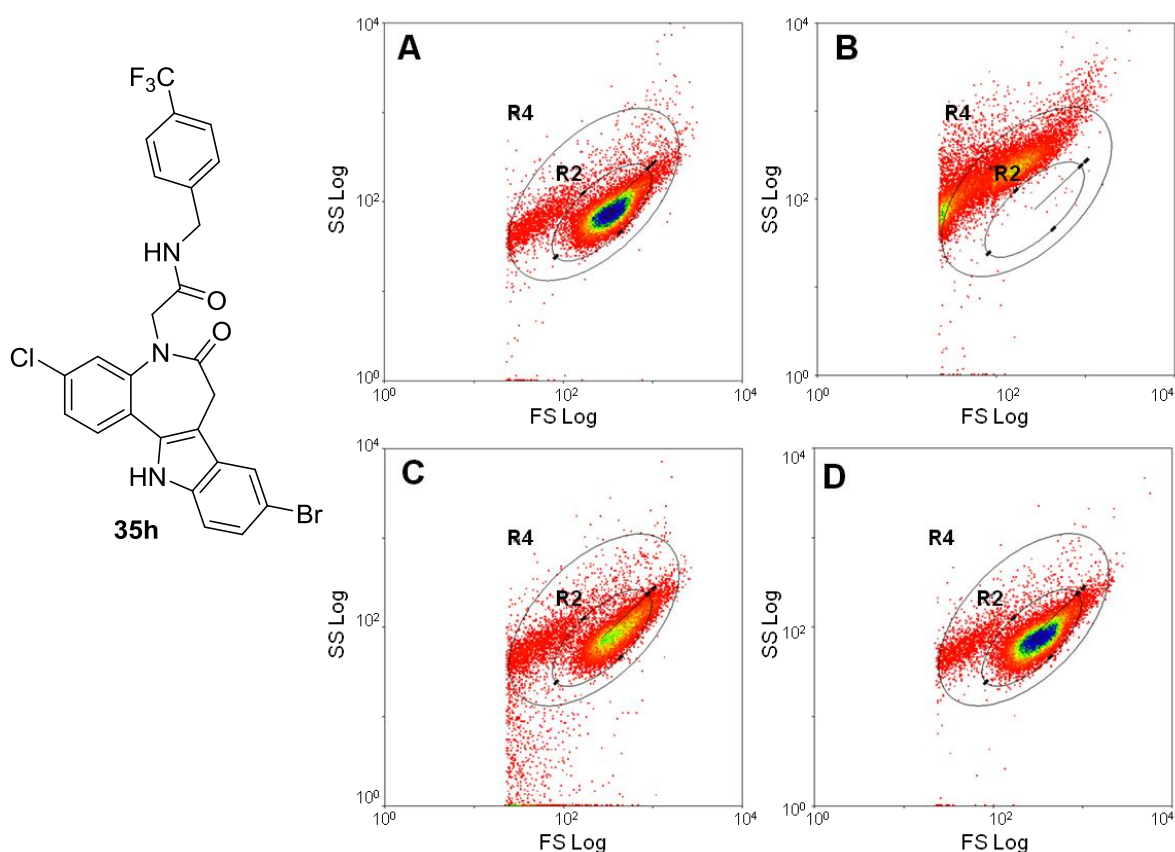
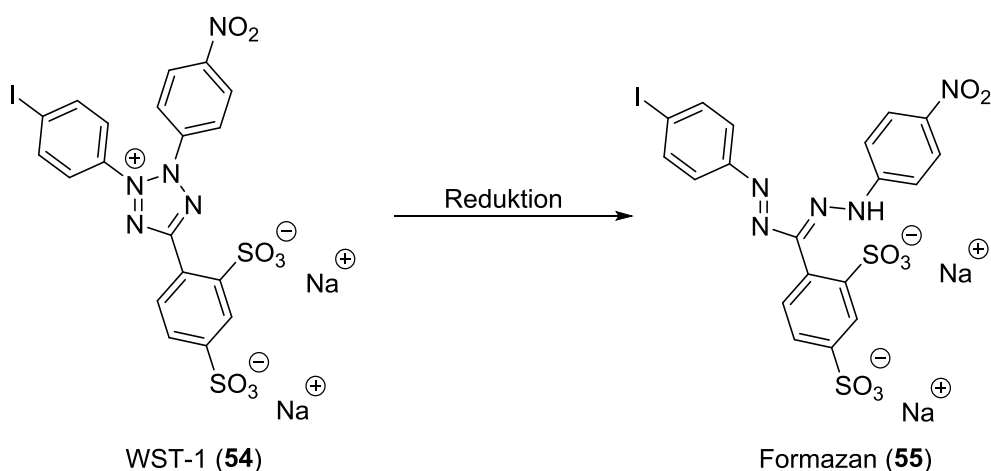


Abbildung 5-1: Ergebnis der Proliferationsuntersuchung von Verbindung **35h**. Es wurde mit dem Durchflusszytometer CyAN™ ADP (DakoCytomation) in Verbindung mit der Software Summit V 4.3 (Dako) gearbeitet. Gemessen wurden die Vorwärtsstreuung und die seitliche Streuung, welche logarithmisch gegeneinander aufgetragen wurden. R2 (innere Ellipse) kennzeichnet den Bereich lebender Parasiten. R4 (äußere Ellipse) kennzeichnet den Bereich toter und lebender Zellen. **A**: Positivkontrolle mit DMSO (1%), **B**: 50 μM Testverbindung, **C**: 1 μM Testverbindung, **D**: 0.005 μM Testverbindung. Die Achsen und die Bezeichnung der festgelegten Bereiche R2 und R4 wurden zur besseren Lesbarkeit nach Aufnahme der Grafiken neu beschriftet.

*L. infantum*-Promastigoten wurden unter Bedingungen kultiviert, die den Gegebenheiten im Insekt gleichen (28 °C, angereichertes RPMI 1640 Glutamax-Medium, pH 7.4). Nach der Inkubation wurden die Parasiten durch eine Paraformaldehydlösung fixiert und die Anzahl lebender Parasiten mit der Neubauer-Kammer bestimmt. Für die Untersuchung wurde eine modifizierte Vorschrift von BENÍTEZ *et al.*<sup>80</sup> verwendet.

## 5.2 Zytotoxizitätsuntersuchungen

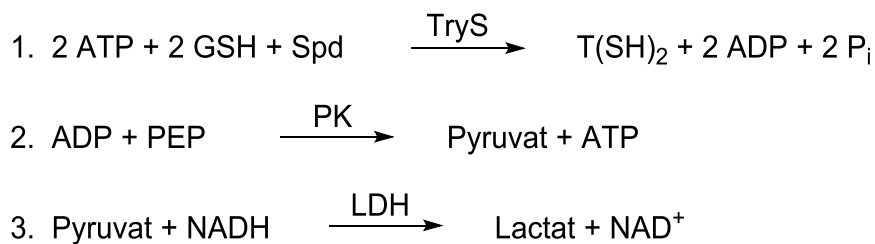
Die Zytotoxizitätsversuche wurden an murinen Makrophagen nach einer Vorschrift von DEMORO *et al.*<sup>124</sup> durchgeführt. Für die Untersuchung wurden die Säugetierzellen für 24 h bei unterschiedlichen Konzentrationen der Testverbindung inkubiert. Um nach erfolgter Inkubation beschädigte und tote Zellen von stoffwechselaktiven Zellen zu unterscheiden, wurde nach einer Auswaschphase der lichtempfindliche Farbstoff WST-1 (*water soluble tetrazolium*, **54**)<sup>125</sup> zugesetzt. Dieser wird durch intakte Zellen zum Formazan (**55**) reduziert, welches UV-spektrometrisch vermessen werden kann (Schema 5-1). Die Reduktion der Monotetrazolium-Salze findet durch NADH-abhängige Oxidoreduktasen und Dehydrogenasen statt. Beim WST-1 erfolgt die Reduktion durch einen transmembranären Elektronentransport unter Beteiligung von mPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium-methylsulfat) als intermediärem Elektronenakzeptor. Die Elektronen werden dabei durch NADH bereitgestellt.<sup>126</sup> Die Verwendung von WST-1 hat den Vorteil, dass es ebenso wie das gebildete Formazan gut wasserlöslich, stabil und wenig toxisch ist.<sup>127</sup>



Schema 5-1: Umsetzung des WST-1 (**54**) zum Formazan **55**. Die Reaktion kann photometrisch verfolgt werden.<sup>125</sup>

### 5.3 Reinigung rekombinanter TryS und TryS-Aktivitätsassay

Die Enzymexpression und Aufreinigung wurde nach Vorschriften von MAIWALD *et al.*<sup>123</sup> und BENÍTEZ *et al.*<sup>80</sup> durchgeführt. Die Expression des Enzyms erfolgte als *N*-terminales His-tag-Protein, was die Aufreinigung vereinfachte. Das Bakterium *Escherichia coli* fungierte dabei als Wirtsorganismus. Der Expression schlossen sich unterschiedliche Aufreinigungsschritte an. Nach DNA-Verdau und Entfernung von Zellfragmenten konnte das Protein mit Hilfe einer IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*) von weiteren Proteinen abgetrennt werden. Hierbei wurden unterschiedlich Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen, die aktives Enzym enthielten, wurden zunächst mit einem gekoppelten Pyruvatkinase-Lactatdehydrogenase-Assay (PK/LDH-Assay, Schema 5-2 und Abbildung 5-2) bestimmt und anschließend vereinigt. Bei dem PK/LDH-Assay handelt es sich um eine Methode zur Aktivitätsbestimmung von ATP-abhängigen Enzymen.<sup>62, 128, 129</sup> Da die Trypanothion-synthetase ein ATP-abhängiges Enzym ist und bei der Biosynthese von Trypanothion ADP anfällt, konnte der PK/LDH-Assay angewandt werden.



Schema 5-2: Ablauf des PK/LDH-Assays. Ausgenutzt wird die Entstehung von ADP bei der Biosynthese von Trypanothion. Die Abnahme der NADH-Konzentration wird photometrisch durch Abfall der Absorption bei 340 nm erfasst.

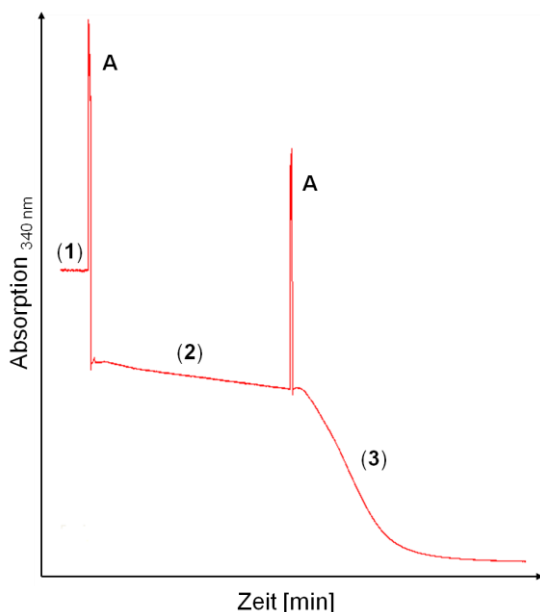


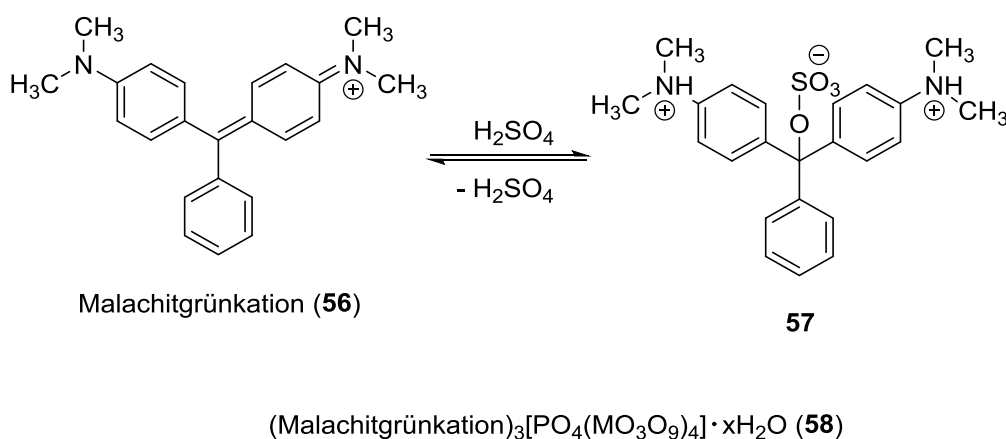
Abbildung 5-2: PK/LDH-Assay am Beispiel der *L*/TryS-Aktivität. (1) Zu Beginn lag in der Quarzküvette eine Mastermixlösung vor, die noch kein Enzym und Spermidin enthielt. (2) Durch Zugabe des Enzyms kommt es bereits zum Abfall der Absorption, was auf eine schwache ATPase-Funktion der TryS hindeutet.<sup>62</sup> (3) Durch Zugabe von Spermidin findet die Trypanothionbiosynthese statt und viel ADP wird gebildet. A: Spikes durch Öffnen des Photometers und durch die Zugabe von Enzym und Spermidin. Die Achse wurde nach Aufnahme der Grafik neu eingezeichnet und in deutscher Sprache beschriftet.



ADP wird bei diesem Assay mit Phosphoenolpyruvat (PEP) unter katalytischer Wirkung der PK zu Pyruvat und ATP umgesetzt. Pyruvat wird dann in einem gekoppelten Reaktionsschritt unter Verbrauch von NADH zu Lactat umgesetzt. Zugewetztes Dithiothreitol (DTT) hielt das Enzym in der aktiven reduzierten Form. NADH absorbiert Licht der Wellenlänge 340 nm. Der Verbrauch an NADH, welcher sich proportional zur Aktivität der TryS verhält, wird durch die Abnahme der Absorption bei 340 nm verfolgt.

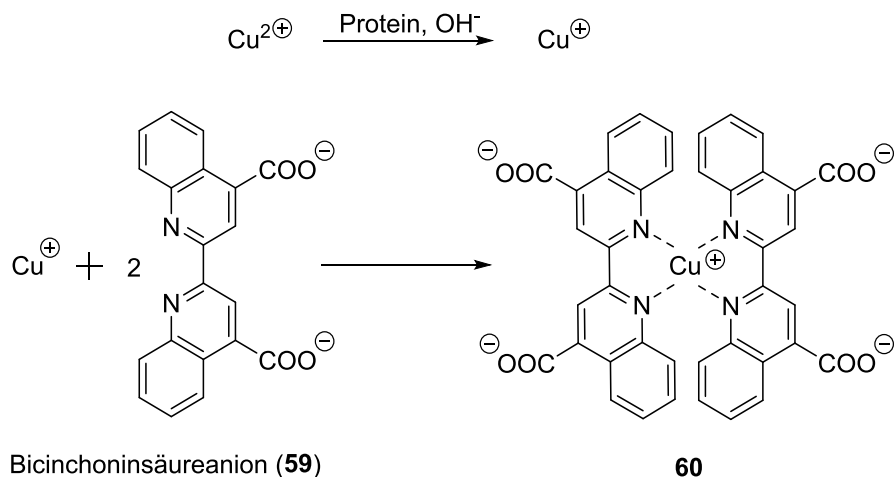
Zur weiteren Aufreinigung des Enzyms schloss sich eine SEC (*size exclusion chromatography*) an. Die Auftrennung erfolgt hierbei nach Molekülgröße. Es wurden unterschiedliche Fraktionen aufgefangen. Der Gehalt an Enzym und deren Aktivität wurde fraktionsweise bestimmt. Fraktionen mit aktivem Enzym wurden vereinigt.

Zur Bestimmung der TryS-Aktivität wurde ein Endpunktassay auf Basis eines Malachitgrün-Reagenzes verwendet, der die Entstehung von anorganischem Phosphat bei der Biosynthese des Trypanothions ausnutzt.<sup>130–133</sup> In dem verwendeten Malachitgrün-Reagenz ist Molybdat vorhanden, welches mit dem anorganischen Phosphat im schwefelsauren Medium zu Dodekamolybdatophosphorsäure reagiert, die mit Malachitgrün (**56**, dargestellt als Kation) einen Komplex **58** eingeht (Schema 5-3). Der Farbkomplex ist bei Anwesenheit von Schutzkolloiden wie Polyvinylalkohol stabil.<sup>132</sup> Die Absorption des grünen Farbkomplexes kann bei 650 nm<sup>133</sup> vermessen werden und ist ein Maß für die Phosphat-Freisetzung und damit für die Aktivität des Enzyms. Unkomplexiertes Malachitgrün ist in saurem Milieu instabil (Schema 5-3), sodass es bei der photometrischen Phosphatdetektion nicht stört.<sup>132</sup>



Schema 5-3: Grundlage der Phosphatbestimmung mittels Malachitgrün-Reagenz. Nach ALTMANN *et al.*<sup>132</sup> setzt sich das Malachitgrünkation (**56**) im schwefelsauren Milieu zu **57** um, welches die photometrische Bestimmung von Phosphat als Komplex nicht stört. Für die Phosphatbestimmung geht Malachitgrün mit Dodekamolybdatophosphorsäure im sauren Milieu einen stabilen Farbkomplex ein (**58**).

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde eine Untersuchung mit Bicinchoninsäure (BCA-Assay, Schema 5-4) durchgeführt. Der verwendete Assay wurde erstmals von SMITH *et al.*<sup>134</sup> beschrieben. Er stellt eine Weiterentwicklung der Biuret-Reaktion dar, bei der zweiwertige Kupferionen im alkalischen Milieu mit den Peptid-Bindungen von Aminosäuren einen gefärbten Komplex eingehen. Bei dem BCA-Assay werden zweiwertige Kupferionen durch Aminosäuren im alkalischen Medium zu einwertigen Kupferionen umgesetzt. Die Reduktion findet während der Komplexbildung des zweiwertigen Ions durch Peptidbindungen, sowie durch Tryptophan, Tyrosin, Cystein und Cystin statt.<sup>135</sup> Im Folgenden gehen die einwertigen Kupferionen mit Bicinchoninsäure (**59**, dargestellt als Dianion) einen stabilen violetten Farbkomplex **60** ein, welcher photometrisch bei 570 nm vermessen wird. Unterschiedliche Konzentrationen an Rinderserumalbumin wurden dabei zur Kalibrierung eingesetzt. Anhand der so aufgestellten Kalibriergerade erfolgte die Bestimmung des Gehalts an Protein in den durch SEC getrennten Fraktionen.



Schema 5-4: Theoretischer Hintergrund des BCA-Assays. Im alkalischen Milieu wird zweiwertiges Kupfer zu einwertigem Kupfer durch Aminosäuren reduziert. Einwertiges Kupfer bildet mit zwei Bicinchoninsäureanionen (**59**) einen gefärbten Komplex **60**.<sup>134</sup>

Zur Überprüfung der Reinheit des Proteins wurde nach Isolierung durch IMAC und Aufreinigung durch SEC eine Gelelektrophorese (SDS-PAGE, 12% Gel, reduzierende Bedingungen, Abbildung 5-3) durchgeführt, wobei ein Molekulargewichtsmarker (*molecular weight marker*, MWM) mitgeführt wurde. Die Proteine wurden nach erfolgter Elektrophorese mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Nach der Aufreinigung war eine Lagerung des Proteins in Puffer unter Zusatz von Glycerol (40%) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für mehrere Monate möglich, ohne dass es zu einem Verlust an Aktivität kam.

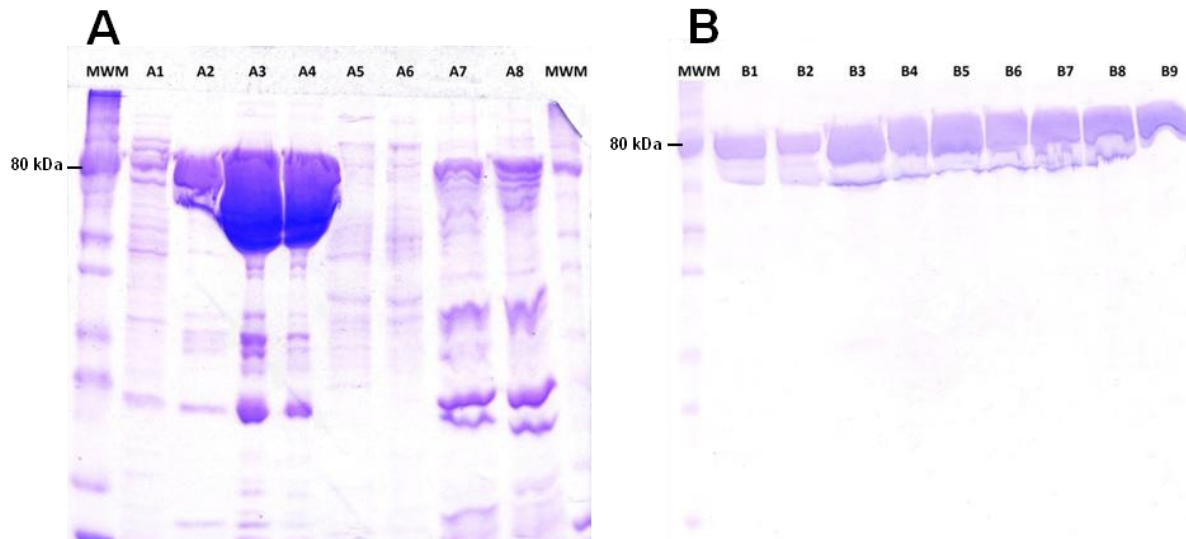


Abbildung 5-3: Ergebnisse der SDS-PAGE nach der IMAC (**A**) und nach der SEC (**B**) am Beispiel der *L*TryS. Die Kavitäten wurden mit den unterschiedlichen Fraktionen A1–A8 und B1–B9 befüllt. Als MWM wurde *protein ladder* 10–250 kDa P7703S (BioLabs) eingesetzt. Aus **A** ist ersichtlich, dass die Fraktion A3 und A4 viel Enzym enthielten. Diese Fraktionen wurden weiter aufgereinigt. **B** zeigt, dass alle aufgefängten Fraktionen B1 bis B9 Enzym enthielten. Bis auf Reste von Verunreinigungen kleineren Molekulargewichtes konnte das Enzym mit Hilfe der SEC rein gewonnen werden. Störende Blasen wurden nach Aufnahme der Grafik entfernt.

Untersuchungen zur Inhibition der *tri-tryp*-TryS (*L*TryS, *Tc*TryS, *Tb*TryS) wurden mit dem oben erwähnten Aktivitätsassay auf Basis eines Malachitgrünkomplexes durchgeführt. Dazu wurde die Testverbindung in DMSO gelöst und mit dem Enzym und den zur Biosynthese des Trypanothions nötigen Edukten inkubiert. Der Zusatz von DTT hielt dabei das Enzym in der aktiven reduzierten Form. Nach Zugabe von Malachitgrün-Reagenz und einer erneuten Inkubation wurde der gebildete grüne Farbkomplex photometrisch bei 650 nm vermessen. Zunächst wurde ein Screening bei 30  $\mu$ M Inhibitorkonzentration durchgeführt. Für aktive Verbindungen erfolgte in einem weiteren Schritt die Ermittlung des  $IC_{50}$ -Werts. Auf Assay-Interferenzen des möglichen Inhibitors wurden mit  $K_2HPO_4$  als  $P_i$ -Standard geprüft.

## 5.4 Ergebnisse der biochemischen und biologischen Evaluierung und Diskussion

Die neuen Paullone **35**, **36** und **37** wurden in verschiedenen Experimenten auf Aktivität an den *tri-tryp*-TryS getestet. Zudem wurde die antiparasitäre Aktivität gegen *T. brucei brucei*-Trypomastigoten der Blutstrom-Form untersucht. Für Verbindungen, die in einem ersten Screening Aktivität zeigten (Enzyminhibition oder Proliferationshemmung >50% unter den jeweiligen Screening-Bedingungen), wurde der IC<sub>50</sub>- beziehungsweise EC<sub>50</sub>-Wert bestimmt. Ergab sich dabei Wachstumshemmung gegenüber *T. brucei brucei*, wurde für die entsprechende Verbindung die Zytotoxizität an Mausmakrophagen ermittelt. Ausgewählte Testsubstanzen konnten in einem weiteren Screening auch auf Aktivität gegen *L. infantum*-Promastigoten getestet werden.

Die Verbindungen **35** (Tabelle 5-1) zielten darauf ab, durch den flachen aromatischen Substituenten am N<sup>5</sup> die TbTryS zu inhibieren. Jedoch zeigten die Verbindungen im Assay nur moderate Aktivität gegenüber dem Zielenzym. So konnten die Verbindungen **35a–g** lediglich 42–58% des Enzyms bei 30 µM inhibieren. Generell zeigten dabei Verbindungen mit Phenylring eine höhere Aktivität an der TbTryS als Verbindungen mit einem terminalen Pyridin-Substituenten (24–35% Enzyminhibition für **35i–k**). Im Vergleich zur TbTryS wurde die TcTryS durch die Verbindungen deutlich besser adressiert. So zeigten die Paullone **35** mit Ausnahme von **35i** und **k** IC<sub>50</sub>-Werte um 10 µM. Gegenüber der LiTryS wies lediglich **35i** einen IC<sub>50</sub>-Wert im einstellig mikromolaren Bereich mit 1.2 µM auf. Durch Verschieben des Pyridin-Stickstoffs in Position 3 fiel die Aktivität um eine Größenordnung. Für ein Paullon mit Pyridin-Stickstoff in Position 2 (**35k**) konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Die Einführung eines Wasserstoffbrücken-Donors in *para*-Stellung (OH) bewirkte eine moderate Inhibition des Enzyms (IC<sub>50</sub> 10 µM). Der Austausch des Donors gegen einen Akzeptor (OCH<sub>3</sub>) oder eine elektronenschiebende Methylgruppe in *para*-Stellung führte zu einem Abfall an Aktivität. Durch Einführung eines *para*-Chlor-Substituenten kam es dabei zu einem vollständigen Aktivitätsverlust an der LiTryS. Das Einführen eines zweiten Chlor-Substituenten in *ortho*-, beziehungsweise das Verschieben des Chlor-Substituenten in *meta*- oder *ortho*-Stellung führte zu Verbindungen mit moderater Aktivität (IC<sub>50</sub> 17–23 µM für **35b–d**).

Obwohl die die Paullone **35** nur mäßige Aktivität an der TbTryS zeigten, konnten einige Verbindungen der Serie als potente Inhibitoren von *T. brucei brucei* identifiziert werden. So zeigten, mit Ausnahme von **35b**, alle Verbindungen mit terminalem Phenyl-Substituenten Aktivitäten im niedrig einstelligen oder submikromolaren Bereich. Dabei stellte **35e** den potentesten *T. brucei brucei*-Inhibitor der Serie **35** mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 0.3 µM dar. Ein

Pyridin-Substituent am  $N^5$  erwies sich in Untersuchungen gegen *T. brucei brucei* als wenig vorteilhaft. So konnten **35i–k** das Wachstum von *T. brucei brucei* in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  nur zu 41–66% hemmen.

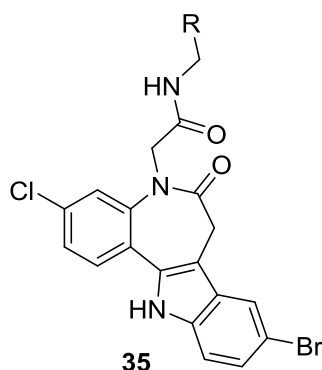


Tabelle 5-1: Biochemische und biologische Evaluierung der Verbindungen **35**.

Verb.	R	<i>TbTryS</i> <sup>a</sup>	<i>TcTryS</i> <sup>a</sup>	<i>LITryS</i> <sup>a</sup>	Proliferation <i>T. b. brucei</i> <sup>b</sup>	Zytotoxizität (SI) <sup>c</sup>
<b>a</b>	4-Cl-Phe	50.1 ± 7.9%	11 ± 2 $\mu\text{M}$	109.1 ± 8.3%	0.8 ± 0.4 $\mu\text{M}$	50–100 $\mu\text{M}$ (>62)
<b>b</b>	2-Cl-Phe	55.3 ± 8.2%	11 ± 3 $\mu\text{M}$	23 ± 4 $\mu\text{M}$	53.2 ± 8.9%	nb
<b>c</b>	3-Cl-Phe	55.9 ± 6.9%	11 ± 2 $\mu\text{M}$	17 ± 3 $\mu\text{M}$	1.1 ± 0.4 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$ (91)
<b>d</b>	3,4-Cl <sub>2</sub> -Phe	42.0 ± 4.2%	9 ± 1 $\mu\text{M}$	19 ± 3 $\mu\text{M}$	0.84 ± 0.4 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$ (12)
<b>e</b>	4-CH <sub>3</sub> -Phe	53.7 ± 3.6%	9 ± 2 $\mu\text{M}$	48.6 ± 8.2%	0.3 ± 0.2 $\mu\text{M}$	50–100 $\mu\text{M}$ (>167)
<b>f</b>	4-OCH <sub>3</sub> -Phe	53.5 ± 3.0%	11 ± 4 $\mu\text{M}$	24 ± 5 $\mu\text{M}$	1 ± 0.6 $\mu\text{M}$	10–200 $\mu\text{M}$ (>10)
<b>g</b>	4-OH-Phe	58.0 ± 7.2%	9 ± 3 $\mu\text{M}$	10 ± 3 $\mu\text{M}$	0.84 ± 0.4 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$ (238)
<b>h</b>	4-CF <sub>3</sub> -Phe	63.5 ± 7.2%	9 ± 2 $\mu\text{M}$	55.4 ± 3.7%	1.8 ± 0.6 $\mu\text{M}$	33–100 $\mu\text{M}$ (>18)
<b>i</b>	Pyridin-4-yl	65.2 ± 3.7%	58.1 ± 5.2%	1.2 ± 0.5 $\mu\text{M}$	49.1 ± 1.4%	nb
<b>j</b>	Pyridin-3-yl	64.8 ± 4.5%	9 ± 3 $\mu\text{M}$	11 ± 3 $\mu\text{M}$	59.4 ± 4.8%	nb
<b>k</b>	Pyridin-2-yl	75.8 ± 4.5%	54.8 ± 9.9%	95.5 ± 3.8%	33.8 ± 4.5%	nb

a TryS-Restaktivität bei 30  $\mu\text{M}$  [%] oder IC<sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ], Fehler ausgedrückt als 2 S.D.

b Proliferation von *T. b. brucei*-Parasiten der Blutstrom-Form bei 5  $\mu\text{M}$  [%] oder EC<sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ], Fehler ausgedrückt als 2 S.D.

c EC<sub>50</sub> murine Makrophagen, Selektivität ausgedrückt als Selektivitätsindex (SI, Quotient EC<sub>50</sub> murine Makrophagen/EC<sub>50</sub> *T. b. brucei*)

nb nicht bestimmt

Die Tatsache, dass einige der  $N^{\delta}$ -substituierten Paullone **35** potent antiparasitäre Wirkung gegenüber *T. brucei brucei* aufwiesen, ohne dabei effektiv die *TbTryS* zu hemmen, bestätigt, dass die Verbindungen neben der TryS weitere parasitäre Zielproteine adressieren. Messungen der Zytotoxizität an murinen Makrophagen ergaben für **35c**, **e** und **g** gute Selektivität für die Parasitenzellen. Die Selektivitätsindices lagen dabei mit 91–238 nahe bei oder bereits über 100. Daneben zeigten **35a**, **f** und **h** die Tendenz, selektiv das Wachstum von *T. brucei brucei* zu inhibieren (SI >10). Lediglich **35d** zeigte eine hohe Toxizität gegenüber den Makrophagen mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 10  $\mu$ M. Die Messungen der Zytotoxizität legen nahe, dass die untersuchten Verbindungen essentielle Proteinkinasen nicht oder nur schwach in den verwendeten Säugetier-Modellzellen inhibieren, denn sonst wäre eine erhöhte Toxizität gegenüber den Mausmakrophagen aufgetreten.

Die Verbindungen **36d–k** (Tabelle 5-2) stellen mit Ausnahme von **36e**  $N^{\delta}$ -substituierte Paullone dar, die in der  $N^{\delta}$ -Seitenkette neutrale Amide tragen, wobei **36j** und **k** zudem am  $N^{\delta}$ -Substituenten eine oder mehrere primäre Alkohol-Gruppen aufweisen. **36e** hingegen besitzt eine Hydroxyethyl-Seitenkette. Dabei zeigt **36e** weder Aktivität an der *TbTryS* noch an der *TcTryS* und inhibierte die *LiTryS* nur moderat ( $IC_{50}$  30  $\mu$ M). Auch für die Paullon- $N^{\delta}$ -acetamide **36d** und **36g–k** war die Aktivität an der *TbTryS* und *TcTryS* vernachlässigbar. Beide Enzyme wurden durch die Verbindungen zu weniger als 45% bei 30  $\mu$ M inhibiert.

Ganz anders verhalten sich **36d** und **36g–k** gegenüber der *LiTryS*. So hemmte **36d** das Enzym im einstellig mikromolaren Bereich ( $IC_{50}$  5.1  $\mu$ M). Weil das Amid als Wasserstoffbrücken-Donor polare Wechselwirkungen mit dem Enzym in *docking*-Untersuchungen gezeigt hatte und weil Paullon- $N^{\delta}$ -acetamide bereits als TryS-Inhibitoren bekannt waren<sup>58, 78, 80</sup> wurden weitere Strukturabwandlungen an **36d** vorgenommen. Der Austausch des primären Amids gegen ein einfaches sekundäres Amid (**36g**) führte zur Aktivitätssteigerung um fast das siebenfache ( $IC_{50}$  0.75  $\mu$ M). Größere aliphatische Reste am Amidstickstoff, wie Ethyl (**36h**) oder *tert*-Butyl (**36i**) hatten einen schwachen Aktivitätsabfall zur Folge und auch ein oder mehrere Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donatoren in Form von primären Hydroxylfunktionen führten nicht zu einem Wiedererlangen von Aktivität im submikromolaren Bereich. Das Konzept, die *LiTryS* durch größere lipophile Substituenten am Amidstickstoff effektiver zu hemmen, konnte nicht umgesetzt werden. Auch Analoga mit primären Alkoholgruppen, für die im *docking* stärkere Ligand-Protein-Wechselwirkungen vorher gesagt worden waren, ergaben keine deutliche Aktivitätssteigerung im Vergleich zum primären oder einfachen sekundären Amid. Wie auch bei einigen Verbindungen **35** konnte für **36d–i** Aktivität gegen den Modellparasiten *T. brucei brucei* festgestellt werden, ohne dass es zu einer effektiven Hemmung der *TbTryS* kam. Dabei inhibierten die Verbindungen die parasitäre Proliferation mit  $EC_{50}$ -Werten von 1.0 bis 3.8  $\mu$ M. Der Mangel an Korrelation

zwischen Enzym-Inhibition auf der einen Seite und antiparasitärer Aktivität auf der anderen Seite lässt auch bei diesen Verbindungen auf ein zusätzliches *target* schließen. Zytotoxizitätsmessungen an murinen Makrophagen ergaben, dass **36e–h** eine gewisse Tendenz zur selektiven Hemmung von *T. brucei brucei* aufweisen (SI >4). Mit **36i** konnte eine Verbindung mit besonders geringer Toxizität ( $EC_{50} >100$ ) und einem hohen Selektivitätsindex identifiziert werden (SI >100).

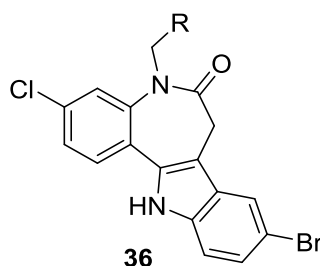


Tabelle 5-2: Biochemische und biologische Evaluierung der Verbindungen **36d–k**.

Verb.	R	<i>TbTryS</i> <sup>a</sup>	<i>TcTryS</i> <sup>a</sup>	<i>LtTryS</i> <sup>a</sup>	Proliferation <i>T. b. brucei</i> <sup>b</sup>	Zytotoxizität (SI) <sup>c</sup>
<b>d</b>	CO-NH <sub>2</sub>	85.5 ± 5.5%	94.8 ± 1.2%	5.1 ± 0.5 µM	1.3 ± 0.6 µM	nb
<b>e</b>	CH <sub>2</sub> OH	87.5 ± 5.0%	122.7 ± 6.1%	30 µM	1.1 ± 0.4 µM	10–100 µM (>9)
<b>g</b>	CO-NHCH <sub>3</sub>	55.6 ± 3.6%	77.2 ± 2.3%	0.75 ± 0.1 µM	2.4 ± 0.8 µM	10–100 µM (>4)
<b>h</b>	CO-NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	102.7 ± 2.7%	58.6 ± 8.3%	1.5 ± 0.2 µM	3.8 ± 0.6 µM	>100 µM (>23)
<b>i</b>	CO-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	89.1 ± 6.8%	94.2 ± 3.3%	2.3 ± 0.4 µM	1.0 ± 0.2 µM	>100 µM (>100)
<b>j</b>	CO-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	98.3 ± 5.8%	105.8 ± 9.1%	2.3 ± 0.3 µM	75.3 ± 20.5%	nb
<b>k</b>	CO-NHC(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	87.4 ± 7.0%	96.2 ± 2.9%	5.2 ± 0.4 µM	91.8 ± 13.0%	nb

a TryS-Restaktivität bei 30 µM [%] oder  $IC_{50}$  [µM], Fehler ausgedrückt als 2 S.D.

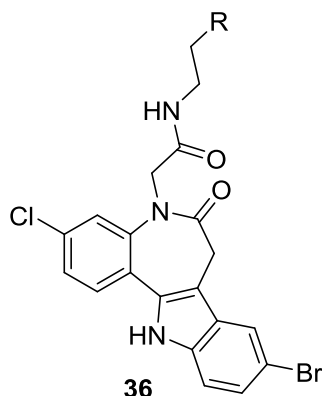
b Proliferation von *T. b. brucei*-Parasiten der Blutstrom-Form bei 5 µM [%] oder  $EC_{50}$  [µM], Fehler ausgedrückt als 2 S.D.

c  $EC_{50}$  murine Makrophagen, Selektivität ausgedrückt als Selektivitätsindex (SI, Quotient  $EC_{50}$  murine Makrophagen/ $EC_{50}$  *T. b. brucei*)

nb nicht bestimmt

In einem weiteren Teilprojekt sollte durch das Einführen einer beziehungsweise zweier basischer Zentren in der  $N^{\delta}$ -Seitenkette eine stärkere Inhibition der *L*TryS erzielt werden (Tabelle 5-3). Da sich aus den vorangegangenen Untersuchungen einfache sekundäre  $N^{\delta}$ -Acetamide als vorteilhaft erwiesen hatten ( $IC_{50}$  0.75  $\mu$ M für **36g** und 1.5  $\mu$ M für **36h**), wurden unter Erhalt dieser funktionellen Gruppe basische Stickstoffe an der  $N^{\delta}$ -Seitenkette eingeführt. So wurde Liganden synthetisiert, bei denen dem sekundären Amid nach zwei Kohlenstoffeinheiten (**36l-q**) oder vier Kohlenstoffeinheiten (**36s**) ein Amin folgte. Durch die eingeführten basischen funktionellen Gruppen, die bei einem physiologischen pH-Wert überwiegend geladen vorliegen, wurden im *docking* teilweise ladungsunterstützte Wasserstoffbrücken oder Salzbrücken vorhergesagt. Untersuchungen an den isolierten *tri-tryp*-TryS zeigten, dass die Serie **36l-s** nur geringe oder keine Hemmwirkung gegenüber der *Tb*TryS zeigte. Es wurde dabei weniger als 28% des Enzyms bei 30  $\mu$ M inhibiert. An der *Tc*TryS wiesen nur **36o** und **36r** Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten im zweistelligen mikromolaren Bereich auf. Durch Abspaltung der sterisch anspruchsvollen Boc-Schutzgruppe kam es jedoch zu einem Verlust dieser Aktivität. Im Fall der *L*TryS ergab die Einführung des basischen Zentrums in der Seitenkette eine Steigerung der Hemmaktivität. So konnte mit **36l** ein submikromolarer Inhibitor identifiziert werden ( $IC_{50}$  0.46  $\mu$ M), der ein tertiäres Amin in der Seitenkette trägt. Durch Fixieren desamins in einem Ringsystem in Form eines Piperidins **36m** kam es zu einem leichten Abfall der Aktivität. Auch der Austausch des Piperidins gegen ein Morpholin **36q** oder Methylpiperazin **36n** führte nicht zu einer verbesserten Inhibition des Enzyms. Durch Einführung eines Piperazins **36p** kam es hingegen zu einer leichten Aktivitätssteigerung, dennoch erreicht **36p** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0.63  $\mu$ M nicht die Potenz von **36l**. Es ist zu vermuten, dass die Bindetasche der *L*TryS in diesem Bereich weniger Raum für einen sterisch anspruchsvolleren aliphatischen Heterozyklus und weniger flexiblen Substituenten bietet. In der Serie stellt **36s** die einzige Verbindung dar, bei der ein primäres Amin über einen viergliedrigen Kohlenstoff-Linker mit dem Paullon- $N^{\delta}$ -acetamid verknüpft ist. Diese Verbindung repräsentiert mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0.39  $\mu$ M den potentesten *L*TryS-Inhibitor dieser Arbeit. Nach den Ergebnissen von *docking*-Studien könnte die flexible Seitenkette der Verbindung leicht Platz in der Bindetasche des Enzyms finden. Zudem wird durch den verlängerten Linker mit dem verknüpften Amin möglicherweise eine weiter entfernte Aminosäure gut adressiert. Außerdem ist auffällig, dass der  $N^{\delta}$ -Substituent von **36s** eine Partialstruktur des Spermidins beziehungsweise Glutathionylspermidins beinhaltet, was eine Interaktion des  $N^{\delta}$ -Substituenten von **36s** mit der Spermidin-Bindetasche als möglich erscheinen lässt. Die Testung der Boc-geschützten Derivate **36o** und **r** zeigte, dass es durch den sterisch anspruchsvollen Rest zu einem Abfall an Aktivität im Vergleich zu den entschützten Verbindungen (**36p** und **s**) kam. Vergleicht man dabei die Inhibition der *Tc*TryS und *L*TryS der ganzen Serie miteinander, so fällt auf, dass sich die Verbindungen invers



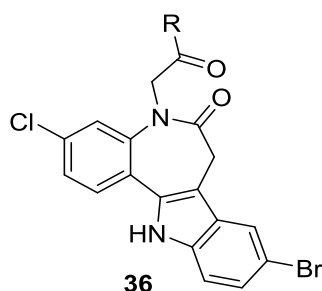


Verb.	R	<i>TbTryS</i> <sup>a</sup>	<i>TcTryS</i> <sup>a</sup>	<i>LfTryS</i> <sup>a</sup>	Proliferation <i>T. b. brucei</i> <sup>b</sup>	Zytotoxizität (SI) <sup>c</sup>
<b>l</b>	N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	84.0 ± 5.6%	82.9 ± 1.1%	0.46 ± 0.1 µM	1–5 µM	6 ± 2 µM (1.2–6)
<b>m</b>	Piperidin-1-yl	79.5 ± 3.2%	78.6 ± 0.01%	0.79 ± 0.1 µM	1–5 µM	9 ± 2 µM (1.8–9)
<b>n</b>	4-Methy- piperazin-1-yl	91.9 ± 6.2%	83.2 ± 5.7%	1.12 ± 0.3 µM	1–5 µM	14 ± 0.2 µM (2.8–14)
<b>o</b>	4-Boc- piperazin-1-yl	75.2 ± 3.6%	20 ± 3 µM	30 µM	nb	nb
<b>p</b>	Piperazin-1-yl 2HCl	101.2 ± 7.5%	92.1 ± 8.4%	0.63 ± 0.1 µM	2.5–5 µM	>100 µM (>40)
<b>q</b>	Morpholin-1-yl	93.9 ± 4.9%	88.7 ± 5.1%	3.3 ± 0.1 µM	87 ± 4%	67 ± 2 µM
<b>r</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH-Boc	72.1 ± 4.6%	25 ± 3 µM	30 µM	nb	nb
<b>s</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> HCl	89.2 ± 2.2%	93.3 ± 8.8%	0.39 ± 0.1 µM	100 ± 4%	>100 µM

nb nicht bestimmt

Einige Verbindungen der Serie **36l–s** zeigen zudem Aktivität gegenüber *T. brucei brucei* mit EC<sub>50</sub>-Werten im einstellig mikromolaren Bereich (1–5 µM für **36l–n** und 2.5–5 µM für **36p**). **36q** mit einer Morpholin-Partialstruktur in der N<sup>6</sup>-Seitenkette inhibiert die Proliferation von *T. brucei brucei* hingegen kaum (87% Proliferation bei 5 µM). Die Verbindung **36s**, die den potentesten *L*TryS-Inhibitor der Arbeit darstellt, zeigt keine Aktivität gegenüber *T. brucei brucei* (100% Proliferation bei 5 µM). Jedoch weisen sowohl **36s** als auch **36p** eine besonders geringe Toxizität gegenüber Mausmakrophagen auf (EC<sub>50</sub> >100). **36l–n** zeigen mit EC<sub>50</sub>-Werten im einstellig beziehungsweise niedrig zweistelligen mikromolaren Bereich (EC<sub>50</sub> 6–24 µM) deutlich höhere Toxizität an den murinen Testzellen, sodass die Selektivitätsindices entsprechend niedrig sind (6–14). **36q** weist hingegen mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 67 µM nur eine moderate Toxizität auf.

In *docking*-Studien, die im Kapitel 3.1.1 zusammengefasst wurden, wurde für sekundäre Amide eine Wasserstoffbrücke indiziert, die durch tertiäre Amide am N<sup>6</sup> nicht möglich wäre. So wurde zunächst angenommen, dass die entsprechenden tertiären Amide **36t–v** (Tabelle 5-4) nur eine geringe Hemmwirkung auf die *L*TryS besitzen. Die Evaluierung der Verbindungen zeigte jedoch, dass Paullone mit einfachen tertiären Amididen am N<sup>6</sup> wie **36t** und **u** in der Lage sind, die *L*TryS mit IC<sub>50</sub>-Werten im submikromolaren Bereich zu inhibieren (IC<sub>50</sub> 0.51 µM für **36t** und 0.5 µM für **36u**). Im Vergleich zu **36t** und **u** zeigt **36v** mit einem großen und sterisch anspruchsvollen Substituenten am N<sup>6</sup> eine deutlich schwächere Aktivität an der *L*TryS (IC<sub>50</sub> 12.5 µM). Auch Paullone mit Fünfring-Heterozyklus in der Seitenkette **36w–y** (Tabelle 5-4) wurden gegen die *tri-tryp*-TryS getestet. Dabei zeigte sich, dass die Inhibition der *L*TryS nur moderat war. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte lagen bei 10–30 µM. Zudem zeigte die ganze Serie **36t–y** gegenüber der *Tb*TryS und der *Tc*TryS keine oder nur schwache Aktivität. So wurden beide Enzyme bei 30 µM Inhibitorkonzentration zu maximal 46% inhibiert. Messungen der antiproliferativen Aktivität gegen *T. brucei brucei* haben gezeigt, dass **36u** die Proliferation der Parasiten mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 5 µM inhibiert. Messungen der Analoga mit Fünfring-Heterozyklen in der Seitenkette zeigten unterschiedliche Aktivitäten gegen den Modellparasiten. So wies das Thiazolin-Derivat **36w** Aktivität im einstellig mikromolaren Bereich auf. Das Oxazol-Derivat **36y** stellt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.2 µM den potentesten *T. brucei brucei*-Inhibitor der Arbeit dar. Das Thiadiazol-Derivat **36x** zeigte keine Aktivität gegen die Protozoen. Auch bei den aktiven N<sup>6</sup>-substituierten Paullonen dieser Serie wurde keine Korrelation zwischen antiparasitärer Aktivität und *Tb*TryS-Inhibition festgestellt, was den *off-target* Effekt der Paullone bestätigt. Untersuchungen der Zytotoxizität an Mausmakrophagen ergaben EC<sub>50</sub>-Werte über 100 µM (**36t**, **u** und **w**) oder zwischen 10 und 100 µM (**36y**). Zudem wiesen die untersuchten Verbindungen eine Tendenz zur selektiven Inhibition von *T. brucei brucei* (SI >25) auf.


 Tabelle 5-4: Biochemische und biologische Evaluierung der Verbindungen **36t–y**.

Verb.	R	<i>Tb</i> TryS <sup>a</sup>	<i>Tc</i> TryS <sup>a</sup>	<i>Li</i> TryS <sup>a</sup>	Proliferation <i>T. b. brucei</i> <sup>b</sup>	Zytotoxizität (SI) <sup>c</sup>
<b>t</b>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	75.4 ± 3.8%	85.1 ± 6.5%	0.51 ± 0.04 µM	91 ± 4%	>100 µM
<b>u</b>	N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	53.6 ± 5.5%	92.2 ± 2.6%	0.5 ± 0.1 µM	5 µM	>100 µM
<b>v</b>	4-(Pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl	72.7 ± 3.9%	59.4 ± 3.7%	12.5 ± 0.2 µM	nb	nb
<b>w</b>	NH(4,5-Dihydro-1,3-thiazol-2-yl)	58.7 ± 5.6%	86.0 ± 2.2%	30 µM	4 µM	>100 µM (>25)
<b>x</b>	NH(1,3,4-Thiadiazol-2-yl)	81.2 ± 3.3%	53.7 ± 1.8%	30 µM	82.6 ± 10.2%	nb
<b>y</b>	NH(1,3-Oxazol-2-yl)	87.8 ± 6.5%	93.1 ± 3.9%	20.1 ± 1.5 µM	0.2 ± 0.2 µM	10–100 µM (>50)

a TryS-Restaktivität bei 30 µM [%] oder IC<sub>50</sub> [µM], Fehler ausgedrückt als 2 S.D.

b Proliferation von *T. b. brucei*-Parasiten der Blutstrom-Form bei 5 µM [%] oder EC<sub>50</sub> [µM], Fehler ausgedrückt als 2 S.D.

c EC<sub>50</sub> murine Makrophagen, Selektivität ausgedrückt als Selektivitätsindex (SI, Quotient EC<sub>50</sub> murine Makrophagen/EC<sub>50</sub> *T. b. brucei*)

nb nicht bestimmt

Unter der Chiffre **37** (Tabelle 5-5) wurden 3-Chlorkenpaullone zusammengefasst, die am Indolstickstoff *N*<sup>12</sup> substituiert sind. Der *N*<sup>5</sup>-Stickstoff der Paullone ist dabei unsubstituiert (**37a** und **c**) oder trägt den gleichen Rest wie der Indolstickstoff (**37b** und **d**). Aus den unter 3.1.1 beschriebenen *docking*-Untersuchungen wurde abgeleitet, dass Paullone mit *N*<sup>12</sup>-Substituent keine Hemmwirkung gegen die untersuchten TryS besitzen sollten, da die Bindetasche in der Nähe des *N*<sup>12</sup>-Stickstoffs keinen Raum für weitere Substituenten bietet. Durch die 3-Chlorkenpaullone **37** sollten die erhaltenen *docking*-Posen evaluiert werden. So werden die *docking*-Studien durch die fehlende Aktivität der Verbindungen **37** an den *tri-tryp*-TryS unterstützt. Für die drei verschiedenen TryS wurden Restaktivitäten von 73 bis 107% bei 30 µM Inhibitor-Konzentration festgestellt.

Testungen mit *T. brucei brucei* zeigten, dass auch  $N^{12}$ -substituierte Paullone mit  $N^5$ -Substituent (**37b** und **d**) beziehungsweise ohne  $N^5$ -Substituent (**37c**) die Proliferation des Parasiten hemmen. Das unbekannte *target* der Verbindungen bietet im Bereich des Indolstickstoffs eine Möglichkeit zur Substitution an dieser Position. Die  $EC_{50}$ -Werte der aktiven Verbindungen lagen mit 1.3 bis 4.0  $\mu M$  nahe zusammen, sodass keinem der beiden Substituenten ( $CH_2CH_3$  oder  $CH_2-COO-CH_2CH_3$ ) eine Präferenz zugesprochen werden konnte. Mit Selektivitätsindices  $>5$  zeigten auch **37b–d** Potential, die Vermehrung von *T. brucei brucei* selektiv zu inhibieren. Die zytotoxische Wirkung, gemessen an murinen Makrophagen, ergab für die drei Verbindungen  $EC_{50}$ -Werte von 10 bis 100  $\mu M$ .

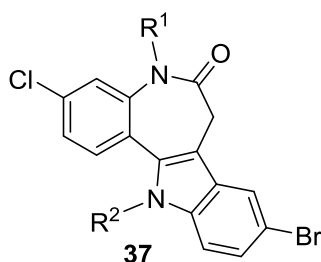


Tabelle 5-5: Biochemische und biologische Evaluierung von Verbindungen **37**.

Verb.	R <sup>1</sup> /R <sup>2</sup>	TbTryS <sup>a</sup>	TcTryS <sup>a</sup>	LiTryS <sup>a</sup>	Proliferation <i>T. b. brucei</i> <sup>b</sup>	Zytotoxizität (SI) <sup>c</sup>
<b>a</b>	H/CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	72.9 ± 3.5%	92.3 ± 3.2%	66.2 ± 4.5%	87.8 ± 6.5%	nb
<b>b</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> / CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	86.9 ± 1.8%	95.8 ± 9.1%	95.7 ± 4.5%	1.3 ± 0.4 $\mu M$	10–100 $\mu M$ ( $>8$ )
<b>c</b>	H/CH <sub>2</sub> -COO- CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	90.8 ± 9.1%	86.6 ± 4.8%	98.9 ± 6.0%	2.0 ± 0.6 $\mu M$	10–100 $\mu M$ ( $>5$ )
<b>d</b>	CH <sub>2</sub> -COO- CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> / CH <sub>2</sub> -COO- CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	88.5 ± 3.7%	107.0 ± 10.4%	87.0 ± 3.0%	4.0 ± 0.2 $\mu M$	100 $\mu M$ (25)

a TryS-Restaktivität bei 30  $\mu M$ , Fehler ausgedrückt als 2 S.D.

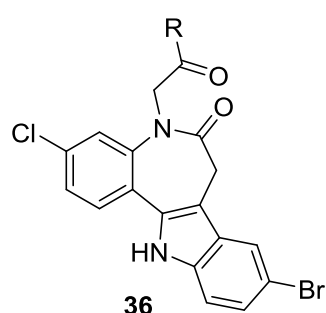
b Proliferation von *T. b. brucei*-Parasiten der Blutstrom-Form bei 5  $\mu M$  [%] oder  $EC_{50}$  [ $\mu M$ ], Fehler ausgedrückt als 2 S.D.

c  $EC_{50}$  murine Makrophagen, Selektivität ausgedrückt als Selektivitätsindex (SI, Quotient  $EC_{50}$  murine Makrophagen/ $EC_{50}$  *T. b. brucei*)

nb nicht bestimmt

Für ausgewählte Verbindungen war es möglich, die antiproliferative Wirkung gegenüber *L. infantum*-Promastigoten zu bestimmen (Tabelle 5-6). Für die Untersuchungen stand ein Durchflusszytometer nicht zur Verfügung. Da es sich bei *L. infantum* um einen humanpathogenen Erreger handelt, war aus Sicherheitsgründen die Verwendung des Durchflusszytometers im Labor des Kooperationspartners nicht möglich. Die Bestimmung der Parasitenzahl erfolgte unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Kammer, was zu hohen Standardabweichungen führte. Die Verbindungen **36d–u** wurden gewählt, da sie die *L*TryS mit IC<sub>50</sub>-Werten von 0.5 bis 5.2 µM inhibieren. **36y** hemmt die Proliferation von *T. brucei brucei* mit einem EC<sub>50</sub>-Wert im submikromolaren Bereich (0.2 µM). Das Screening gegen *L. infantum*-Promastigoten zeigte, dass keine der Verbindungen die Proliferation der Parasiten stärker als 50% hemmte. Die aktivste Verbindung **36i** inhibierte bei 5 µM die Vermehrung der Promastigoten um 47%. Zu den Ergebnissen dieser Testreihe ist zu sagen, dass *L. infantum*-Promastigoten im Insekt und nicht im humanen Wirt auftreten. Messungen an *L. infantum*-Amastigoten wären daher wünschenswert, um die Effektivität der synthetisierten Verbindungen gegen die humanpathogene Form des Erregers abschätzen zu können.

Tabelle 5-6: Untersuchungen zur Hemmwirkung ausgewählter Verbindungen auf *L. infantum*-Promastigoten.



Verb.	R	Proliferation <i>L. infantum</i> <sup>a</sup>
<b>d</b>	NH <sub>2</sub>	85.0 ± 35.7%
<b>g</b>	NHCH <sub>3</sub>	87.2 ± 55.1%
<b>h</b>	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	67.0 ± 15.1%
<b>i</b>	NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	53.1 ± 31.5%
<b>j</b>	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	68.1 ± 7.3%
<b>k</b>	NHC(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	76.2 ± 1.2%
<b>u</b>	N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	67.0 ± 15.1%
<b>y</b>	NH(1,3-Oxazol-2-yl)	86.1 ± 30.3%

a Proliferation von *L. infantum*-Promastigoten bei 5 µM, Fehler ausgedrückt als 2 S.D.

## 6. Physikochemische Eigenschaften

Bei der Entwicklung von oral applizierbaren Wirkstoffen sind die physikochemischen Eigenschaften einer Substanz entscheidend für ihre biologische Verfügbarkeit. Um die *druglikeness* einer Verbindung in der frühen Wirkstoffentwicklung zu charakterisieren, wurde die Lipinski *rule of five* (RO5) entwickelt. So sind bei einer Vielzahl (90%) an oral verfügbaren Wirkstoffkandidaten, die die zweite klinische Prüfphase erreicht haben, vier physikochemische Gegebenheiten zu beobachten: Relative Molmasse  $\leq 500$ , ein logP-Wert  $\leq 5$ , eine Anzahl an Wasserstoffbrückendonatoren  $\leq 5$  und eine Anzahl an Wasserstoffbrückenakzeptoren  $\leq 10$ . Wird die Lipinski RO5 nicht erfüllt, so ist mit Schwierigkeiten bei der oralen Verfügbarkeit des Wirkstoffkandidats zu rechnen, was weitere klinische Untersuchungen mit dieser Substanz in Frage stellt.<sup>136</sup>

Die neuen Paullone wurden auf die Einhaltung der RO5 untersucht. Daten hierzu, sowie zu weiteren physikochemischen Parametern befinden sich im folgenden Unterkapitel (Tabelle 6-1) und im experimentellen Teil dieser Arbeit. Der logP-Wert der neuen Substanzen wurde isoliert betrachtet. Der Wert stellt den Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten dar und macht eine Aussage über die Lipophilie einer Verbindung. Er ist besonders relevant für die Permeabilität und damit für die Absorption einer Verbindung.<sup>137</sup> Der jeweils aufgeführte logP-Wert repräsentiert dabei den Mittelwert aus fünf verschiedenen Vorhersagen (iLOGP<sup>138</sup>, XLOGP3 berechnet mit dem XLOGP Programm Version 3.2.2, WLOGP<sup>139</sup>, MLOGP<sup>140–142</sup> und SILICOS-IT berechnet mit dem FILTER-IT Programm Version 1.0.2<sup>143</sup>), die mit Hilfe des Computerprogramms SwissADME<sup>144</sup> kalkuliert wurden. Weiterführend wurde auch die Wasserlöslichkeit der neuen substituierten Paullone mit diesem Programm vorhergesagt. Die Wasserlöslichkeit wurde als logS-Wert der Verbindung abgeschätzt. Der logS-Wert beruht dabei auf dem Mittelwert aus drei verschiedenen Vorhersagen (ESOL<sup>145</sup>, Ali<sup>146</sup> und SILICOS-IT berechnet mit dem FILTER-IT Programm Version 1.0.2<sup>143</sup>), die ebenfalls mit SwissADME erzeugt wurden.

Für einzelne Verbindungen wurde anschließend die thermodynamische Löslichkeit mit einer modifizierten *shake flask*-Methode nach WÖLFEL bestimmt.<sup>147</sup> Unter der thermodynamischen Löslichkeit versteht man die maximale Konzentration der stabilsten kristallinen Form einer Substanz, die in einem gegebenen Volumen eines Lösungsmittels unter gegebener Temperatur und gegebenem Druck in Lösung bleibt.<sup>148</sup> Für die Methode wurde die Substanz in einem Whatman® Mini-UniPrep®-Vial in Puffer (pH 7.4, 25 °) für 24 und 48 h inkubiert. Während der Inkubation wurde auf das Vorhandensein eines Bodenkörpers geachtet. Die Bestimmung der Löslichkeit erfolgte anhand einer Kalibriergerade. Für die Kalibriergerade

wurden aus einer DMSO-Stammlösung Verdünnungen mit Acetonitril hergestellt. Die Verdünnungen wurden mit Hilfe der HPLC vermessen und die AUC gegen die Konzentration aufgetragen. Die Konzentrationsbestimmung der inkubierten Probe erfolgte über die Bestimmung der AUC der inkubierten Proben. Die Bestimmung einer zweiten Probe nach 48 h Inkubation garantierte dabei eine vollständige Gleichgewichtseinstellung zwischen der Lösung und dem kristallinen Feststoff.

Für ausgewählte Proben war es möglich, die kinetische Löslichkeit unter Zuhilfenahme eines Nephelometers zu untersuchen. Die Experimente wurden nach einer modifizierten Vorschrift von BEVAN *et al.*<sup>149</sup> durchgeführt. Es wurden hierfür gleiche Volumina verschiedener DMSO-Verdünnungen der Testsubstanz zu einem Puffer pH 7.4 getropft. Im Anschluss wurde der Ansatz direkt mit einem Nephelometer vermessen. Mit diesem Gerät wird das Streulicht des Ansatzes erfasst. Durch das Ausfallen der Substanz bei höheren Substanzkonzentrationen kommt es zu einer verstärkten Lichtstreuung. Der abrupte Anstieg des Streulichtes markiert dabei die Konzentration, bei der die kinetische Löslichkeit der Verbindung liegt. Es ist die Konzentration erreicht, bei der das wässrige Medium nicht mehr vollständig die Testsubstanz solvatisieren kann und bei der die sich am schnellsten bildende Form der Verbindung ausfällt.<sup>148</sup> Die Bestimmung der kinetischen Löslichkeit ist in Abbildung 6-1 dargestellt.

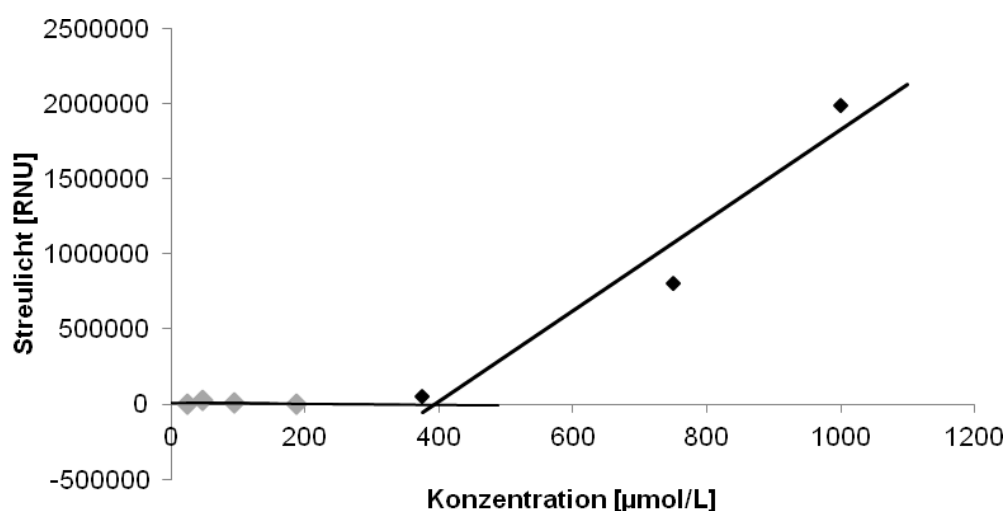


Abbildung 6-1: Ergebnis der Untersuchung zur kinetischen Löslichkeit von **36k**. Ist die kinetische Löslichkeit der Substanz erreicht, kommt es zu einer Trübung des Ansatzes durch präzipitierende Substanz. Die entstehende Suspension führt zu einer entsprechenden Lichtstreuung, die mit steigender Konzentration zunimmt. Der Schnittpunkt der beiden Ausgleichsgeraden definiert die kinetische Löslichkeit. Die Auswertung erfolgte nach Herstellerangaben.<sup>150</sup>

## 6.1 Ergebnisse der Untersuchung von physikochemischen Eigenschaften und Diskussion

Die Untersuchungen zur Einhaltung der *RO5* zeigen, dass einige der in dieser Arbeit neu hergestellten Paullone den Regeln von Lipinski entsprechen. Viele Verbindungen weisen jedoch eine relative Molmasse von über 500 g/mol und einige Verbindungen einen logP-Wert über 5 auf. Diese Regelverstöße gegen die *RO5* können zu Problemen bei der Bioverfügbarkeit der möglichen Wirkstoffe führen. Die Berechnungen zum logP-Wert zeigen, dass die neuen Verbindungen in der Regel jedoch eine akzeptable Lipophilie aufweisen. Polare funktionelle Gruppen wie Alkoholfunktionen bei **36j** und **k** führen dabei zu einer deutlich verringerten Lipophilie (logP **36j** 2.95 und **36k** 1.95). Für die Ammoniumchloride **36p** und **36s** wurde, trotz des großen aromatischen Systems und der aliphatischen Seitenkette aus mehreren Kohlenstoffatomen, ebenfalls eine geringe Lipophilie vorhergesagt (logP **36p** 0.96 und **36s** 2.57). Die Vorhersagen zur Wasserlöslichkeit zeigen hingegen, dass Alkoholfunktionen einen größeren Einfluss auf die theoretische Wasserlöslichkeit haben als die Ammoniumgruppen. So wurde für **36j** und **k** eine Wasserlöslichkeit von 3.95 und 21.38 µmol/L prognostiziert, wohingegen für **36p** und **s** eine theoretische Wasserlöslichkeit von 1.32 und 0.91 µmol/L berechnet wurde. Die prognostizierte Wasserlöslichkeit der neuen Verbindungen ist gering. So wurden für 72% der neuen Verbindungen eine theoretische Wasserlöslichkeit von unter 1 µmol/L vorhergesagt. Die Ergebnisse der Experimente zur thermodynamischen Löslichkeit sind ebenfalls in Tabelle 6-1 dargestellt. Sie zeigen, dass die Löslichkeit der untersuchten Verbindungen unter der Grenze der Quantifizierung liegt. Die experimentellen Daten bestätigen damit die Vorhersagen zur Wasserlöslichkeit der neuen Paullone. Eine Löslichkeit von 60 µg/mL (entspricht 120 µmol/L bei einer relativen Molmasse von 500 g/mol), die wünschenswert für weiterführende klinische Prüfungen ist,<sup>151</sup> konnte nicht erreicht werden. Experimente mit den Verbindungen **36k** und **p** zeigen, dass deren kinetische Löslichkeit mit 392 beziehungsweise 124 µmol/L erwartungsgemäß deutlich höher als die nicht bestimmbare thermodynamische Löslichkeit ist. Es wurde bei Experimenten zur kinetischen Löslichkeit die Löslichkeit der sich am schnellsten bildenden Modifikation der Testverbindung gemessen. Bei den Experimenten zur thermodynamischen Löslichkeit wurde die Löslichkeit der thermodynamisch stabilsten Modifikation der Verbindung ermittelt. Die aromatischen Systeme der neuen Paullone können als Erklärung für die schlechte Wasserlöslichkeit heran gezogen werden. So führen die zahlreichen aromatischen Substrukturen der Verbindungen zu hydrophoben Wechselwirkungen der Moleküle untereinander. Der logP-Wert und damit die Lipophilie der näher untersuchten Verbindungen liegt in der Regel in einem annehmbaren Bereich (logP 0.96 bis 4.94 für die in Tabelle 6-1 gezeigte Verbindungen). Eine unzureichende Löslichkeit aufgrund von hoher Lipophilie



scheint somit unwahrscheinlich. Dabei ist zu beachten, dass die Experimente zur kinetischen Löslichkeit in einem Puffermedium unter Zusatz von DMSO (5%) durchgeführt wurden. Der DMSO-Zusatz führte zu einer besseren Löslichkeit der Verbindungen.

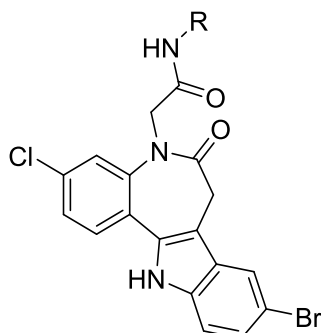


Tabelle 6-1: Physikochemische Eigenschaften ausgewählter neuer Paullone.

Verb.	R	RO5 <sup>a</sup>	logP <sup>b</sup>	S <sub>0</sub> , theor. [μmol/L] <sup>c</sup>	S <sub>0</sub> , therm., exp. [μmol/L] <sup>d</sup>	S <sub>0</sub> , kin., exp. [μmol/L] <sup>e</sup>
<b>35e</b>	CH <sub>2</sub> -(4-CH <sub>3</sub> -Phe)	MW >500	4.94	0.01	<0.48	nb
<b>35g</b>	CH <sub>2</sub> -(4-OH-Phe)	MW >500	4.07	0.06	<4.8	nb
<b>36j</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	entspricht	2.95	3.95	<5.0	nb
<b>36k</b>	C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	MW >500	1.95	21.38	<5.0	392
<b>36p</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -Piperazin-1-yl 2HCl	MW >500 <sup>f</sup>	0.96 <sup>f</sup>	1.32 <sup>f</sup>	<5.0	124
<b>36s</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> HCl	entspricht <sup>f</sup>	2.57 <sup>f</sup>	0.91 <sup>f</sup>	<5.0	nb

a Einhaltung der RO5 gegebenenfalls unter Angabe des Verstoßes

b logP-Wert als Mittelwert aus fünf Vorhersagen (iLOGP, XLOGP3, WLOGP, MLOGP, SILICOS-IT) berechnet mit SwissADME

c Wasserlöslichkeit als Mittelwert aus drei Vorhersagen (ESOL, Ali, SILICOS-IT), berechnet mit SwissADME

d Thermodynamische Löslichkeit bestimmt mit einer *shake flask*-Methode nach WÖLFEL in Puffer pH 7.4

e Kinetische Löslichkeit bestimmt als Einzelbestimmung in Puffer pH 7.4 unter Zusatz von DMSO (5%) nach BEVAN *et al.*

f berechnet für die protonierte Form ohne Gegenion

nb nicht bestimmt

Bei den biologischen Assays wurden die Beobachtungen zur kinetischen Löslichkeit bestätigt, denn für Zytotoxizitätsbestimmungen wurden ebenfalls aus DMSO-Stammlösungen Verdünnungen mit wässrigem Medium hergestellt und für den Assay verwendet, ohne dass die Testverbindungen bei hohen Konzentrationen ausfielen. **35g** wurde in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  in Tests eingesetzt. Auch nach 24 h Inkubation in wässrigem Medium konnte keine Präzipitation der Verbindung lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. Sofern allerdings Arzneistoffe in festen oralen Applikationsformen eingesetzt werden, ist die thermodynamische Löslichkeit von größerer Aussagekraft als die kinetische, da vor der Absorption im Gastrointestinaltrakt zunächst die Auflösung des Arzneistoffs erfolgen muss.

## 7. Synthese von Reagenzien für Affinitätsuntersuchungen

Um weitere parasitäre Zielproteine der Paullone zu ermitteln, wurde in einem Teilprojekt angestrebt, ein  $N^6$ -substituiertes Paullon für eine Immobilisierung an einem derivatisierten Agarosegel vorzubereiten. Durch Affinitätsuntersuchungen mit Parasiten-Homogenat von *T. brucei brucei* sollten Proteine isoliert werden, die eine Affinität zu dem immobilisierten Paullon aufweisen. Nach Aufreinigung durch Spülvorgänge, Auftrennung durch eine Gelelektrophorese und massenspektrometrische Analyse der isolierten Proteine sollten Paullon-affine Proteine als potenzielle Zielstrukturen in den Parasiten identifiziert werden (Abbildung 7-1). Um eine gute sterische Verfügbarkeit des Liganden zu erreichen und damit eine möglichst große Affinität des gebundenen Paullons zum Zielprotein zu erzielen, sollte das Paullon über einen *spacer* an das derivatisierte Agarosegel geknüpft werden.<sup>152</sup> Durch die Verwendung einer hydrophilen *spacer*-Kette sollten unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen mit Proteinen vermieden werden.<sup>153</sup> Allerdings findet man in der Literatur auch Hinweise auf unspezifische Interaktionen von hydrophilen *spacer*-Elementen mit Proteinen, wodurch die Isolierung eines Zielproteins erschwert wird.<sup>152</sup>

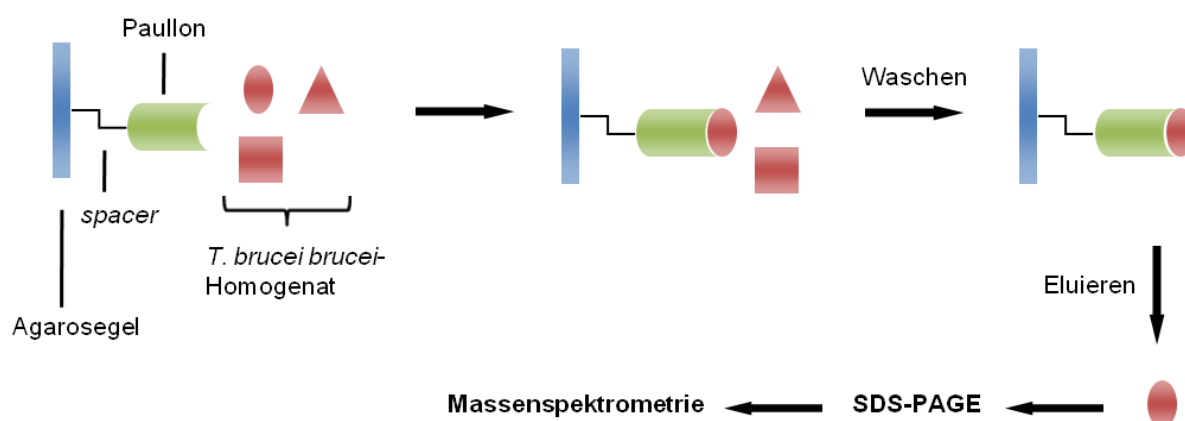


Abbildung 7-1: Möglicher Ablauf einer Affinitätsuntersuchung mit einem immobilisierten Paullon. Das Paullon wird über einen hydrophilen *spacer* mit dem Agarosegel verknüpft. Es folgt eine Inkubation mit Parasiten-Homogenat. Proteine, die eine Affinität zum Paullon aufweisen, werden gebunden. Nicht affine Proteine werden durch Waschgänge entfernt. Anschließend werden affine Proteine vom Paullon gelöst und eluiert. Zur Identifikation kann eine SDS-PAGE mit anschließender massenspektrometrischer Untersuchung der Proteinbanden folgen.

Die von KORN beschriebene Verbindung **33**<sup>154</sup> zeigt gute antiparasitäre Wirkung gegen *T. brucei brucei* ohne dabei potent die *TbTryS* zu inhibieren. Für die Affinitätsuntersuchung sollte **33** mit einem Ethylenglycol-*spacer* verknüpft werden. Die Syntheseroute sollte

schlussendlich zu der Struktur **61** führen (Abbildung 7-2). Über das terminale primäre Amin kann die Struktur an ein derivatisiertes Agarosegel gebunden werden. Das Agarosegel trägt endständig *N*-Hydroxysuccinimid-Ester-Gruppen. Unter Amidbildung werden diese abgespalten und das Paullon wird am Agarosegel fixiert.

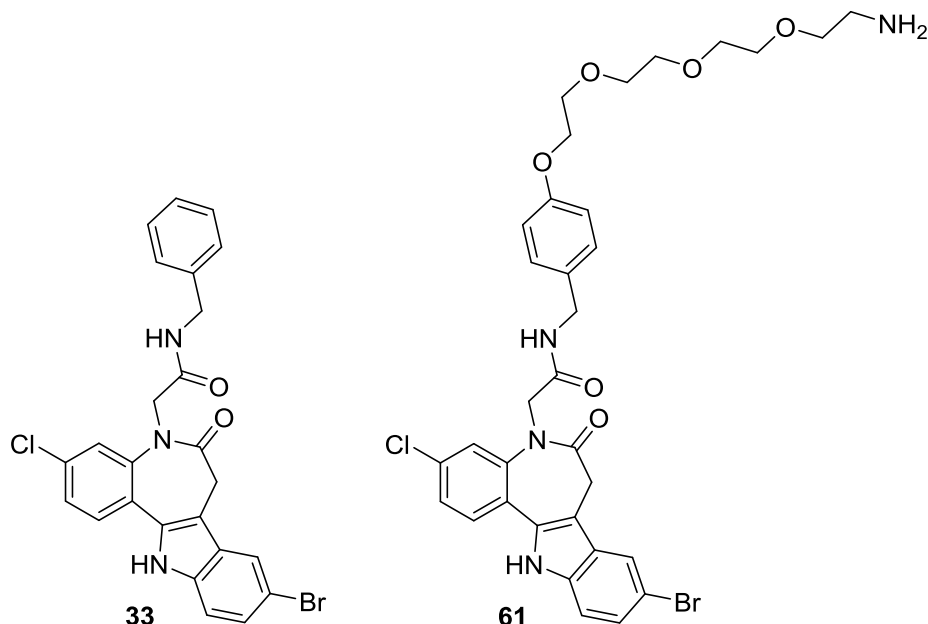
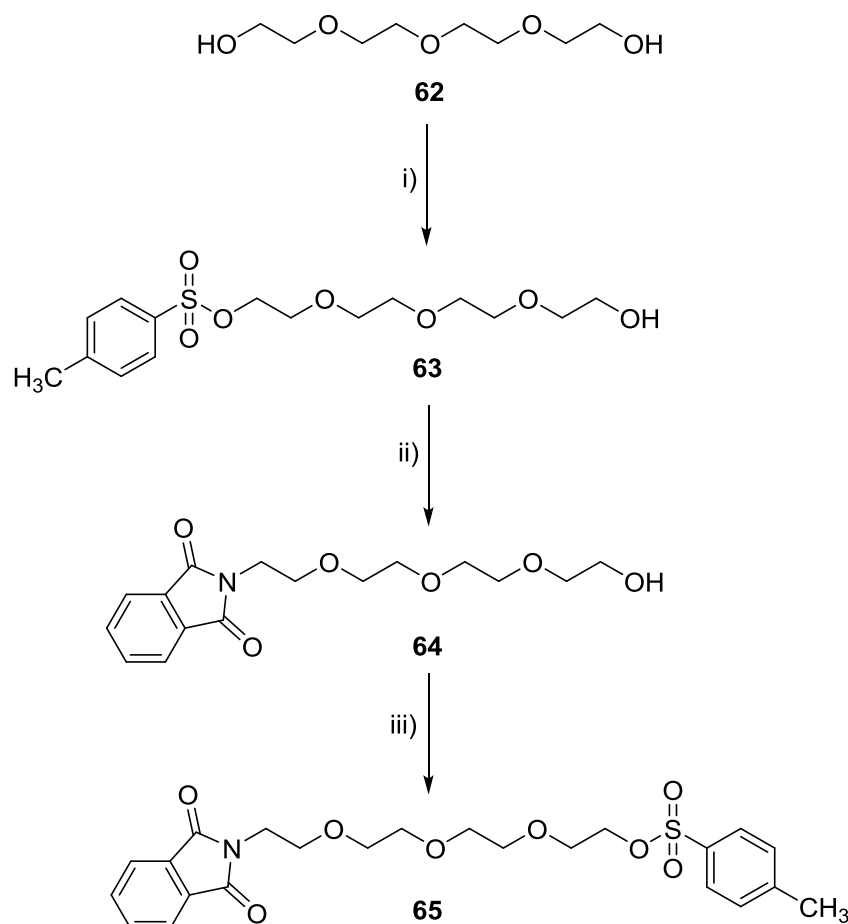


Abbildung 7-2: Verbindung **33** und geplantes Syntheseeziel **61**. **61** beinhaltet eine Partialstruktur von **33**.

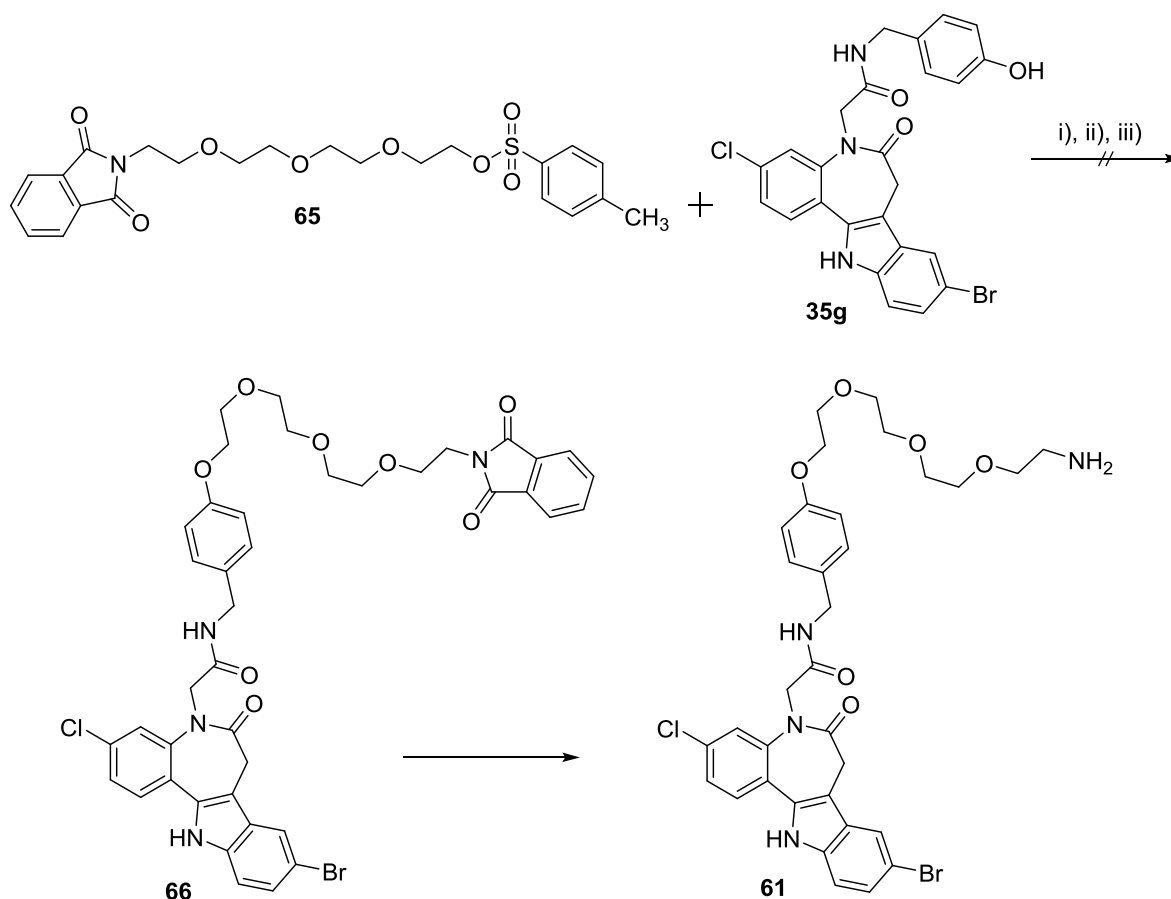
Als *spacer* wurde, wie aus Abbildung 7-2 ersichtlich, ein Tetraethylenglykol-Derivat in Betracht gezogen. Der *spacer* sollte zunächst separat synthetisiert werden (Schema 7-1) und anschließend mit einem Paullon verknüpft werden. Die dreistufige Synthese des *spacer*-Elements erfolgte nach Vorschriften von PRÜHS.<sup>155</sup> Hierfür wurde zunächst Tetraethylenglykol (**62**) mit 4-Methylbenzensulfonylchlorid zum Methylbenzensulfonat **63** umgesetzt. In einer anschließenden nukleophilen Substitutionsreaktion mit Phthalimid-Kalium wurde eine Amin-Schutzgruppe am Molekül eingeführt. Das Tosylat diente bei der Synthesereaktion zu **64** als gute Abgangsgruppe. In einem dritten Reaktionsschritt wurde die zweite primäre Alkoholfunktion des ursprünglichen Tetraethylenglykols mit 4-Methylbenzensulfonylchlorid zu der Struktur **65** umgesetzt. Im weiteren Verlauf der Synthesesequenz sollte die Verbindung **65** in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit dem entsprechenden Paullon verknüpft werden.



Schema 7-1: Synthesesequenz des polaren *spacers* **65** ausgehend von Tetraethylenglycol (**62**). Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeuten: i)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , TEA, DMAP, 4-Methylbenzensulfonylchlorid,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 8 h, RT, 15 h, 27%; ii) DMF, Phthalimid-Kalium,  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , 8 h, 37%; iii)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , TEA, DMAP, 4-Methylbenzensulfonylchlorid,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 8 h, RT, 15 h, 70%.

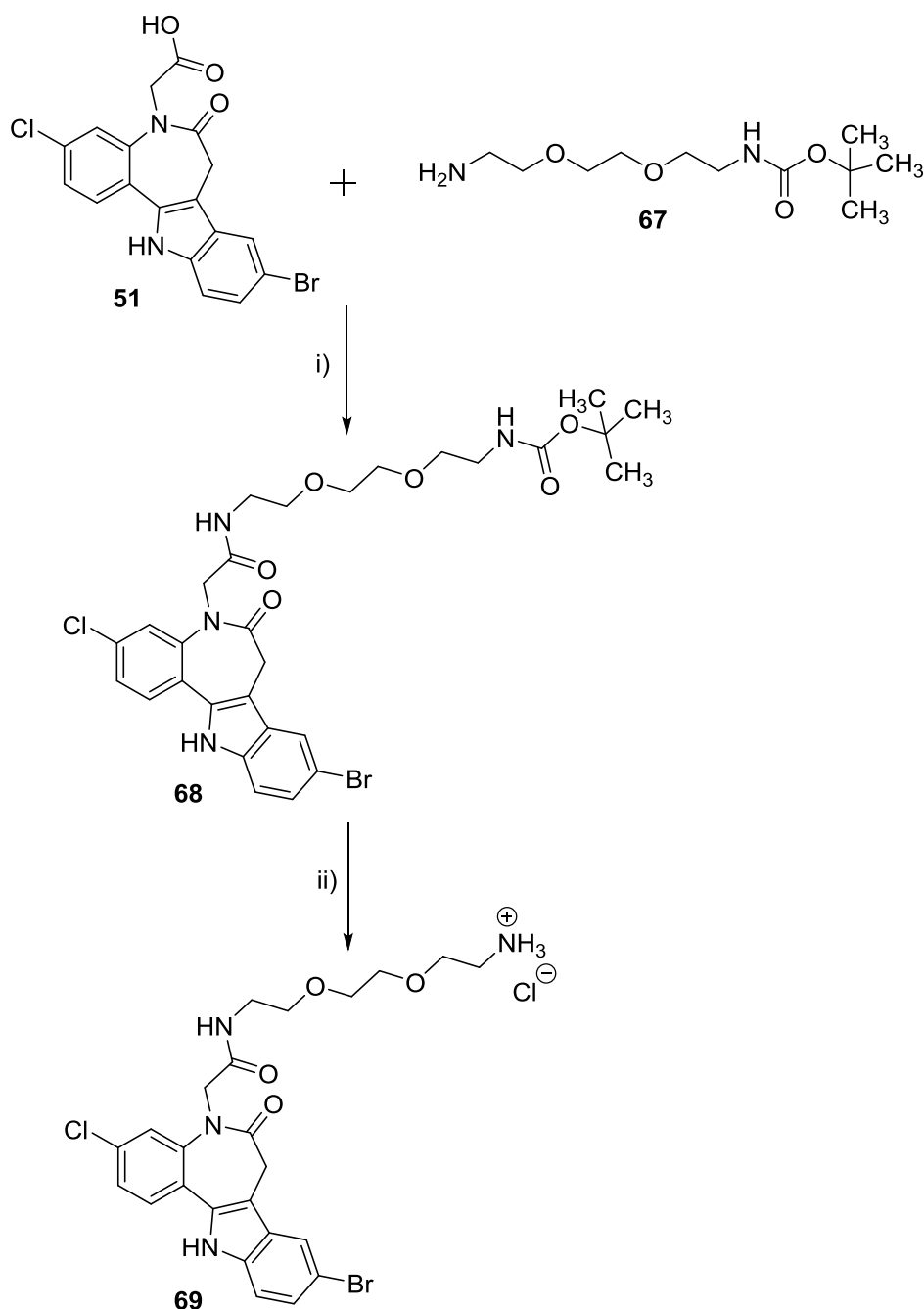
In einer sich anschließenden Synthesesequenz sollte die Verbindung **65** in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit dem Paullon **35g** zu Verbindung **66** umgesetzt werden. In einer Hydrazinolyse-Reaktion sollte die Amin-Schutzgruppe der Verbindung **66** abgespalten werden, um anschließend die Zielverbindung **61** über das freie Amin an ein derivatisiertes Agarosegel binden zu können. Versuche zur Synthese von **61** sind in Schema 7-2 dargestellt. Für die nukleophile Substitutionsreaktion wurden zunächst Reaktionsbedingungen gewählt, die nach PRÜHS<sup>156</sup> bei Darponen zu einer selektiven Substitution an einer phenolischen Hydroxylgruppe geführt haben. Als Lösungsmittel wurde Acetonitril und als Base Kaliumcarbonat verwendet. Dünnschichtchromatographisch konnte unter diesen Bedingungen keine Umsetzung der Verbindung **65** mit dem Paullon **35g** nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass sich das Paullon **35g** nur unzureichend in Acetonitril löste. Aus diesem Grund wurde das Lösungsmittel gegen Dimethylformamid ausgetauscht und für eine bessere Umsetzung der Edukte die Base Cäsiumcarbonat

verwendet. Bei diesen Bedingungen wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung NMR-spektrometrisch lediglich ein disubstituiertes Produkt nachgewiesen. Bei diesem isolierten Produkt hat auch am Indolstickstoff des Paullons **35g** eine Substitutionsreaktion stattgefunden. Im Folgenden wurde eine Vorschrift von WIEKING<sup>157</sup> herangezogen, die selektive Substitutionen an Paullonen mit phenolischen Hydroxylgruppen thematisiert. Die Verwendung von getrocknetem DMSO als Lösemittel und einem großen Überschuss an Kaliumcarbonat führte zu einer vollständigen Umsetzung der verwendeten Edukte, was dünnschichtchromatographisch nachgewiesen wurde. Jedoch war eine säulenchromatographische Isolierung des gewünschten Produktes nicht möglich, da eine Vielzahl an Nebenprodukten entstanden war. Auch Versuche, den *spacer* **65** an der Synthesestufe von **35g**, dem 4-Hydroxybenzylamin Hydrobromid, in Acetonitril unter Zusatz von Cäsiumcarbonat anzubringen, schlugen fehl (Schema graphisch nicht dargestellt). Eine selektive Substitution an der phenolischen Hydroxylgruppe der Verbindung **35g** wurde daher nicht weiter verfolgt.



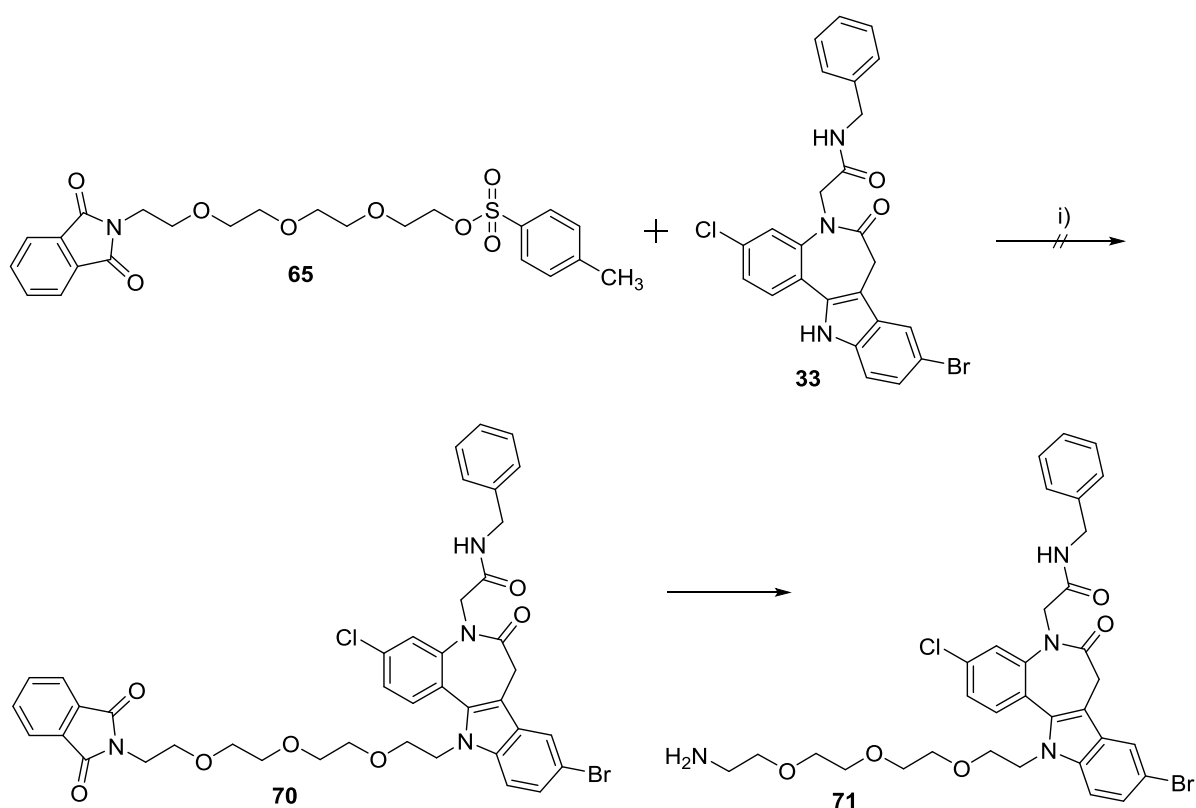
Schema 7-2: Versuche zur Synthese der Verbindung **61** durch Umsetzung des Paullons **35g** mit dem Tetraethylenglykol-Derivat **65**. Reaktionsbedingungen und Reagenzien: i) Acetonitril, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Reflux; ii) DMF, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Reflux; iii) getrocknetes DMSO, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, RT. Für die Abspaltung der Amin-Schutzgruppe war eine Hydrazinolyse mit Hydrazin-Monohydrat in Methanol geplant.

Um dennoch ein  $N^5$ -substituiertes Paullon für eine Affinitätsuntersuchung zugänglich zu machen, wurde die Paullon- $N^5$ -carbonsäure **51** analog zu der unter 4.4.2 beschriebenen Amidkupplung mit dem hydrophilen Amin **67** zum  $N^5$ -substituierten Paullon **68** umgesetzt. Die Boc-Schutzgruppe wurde in getrocknetem Dichlormethan mit Trifluoressigsäure abgespalten und die Zielverbindung **69** als Hydrochlorid in Diethylether gefällt (Schema 7-3).



Schema 7-3: Synthese eines  $N^5$ -substituierten Paullons **69** zur Affinitätsuntersuchung. Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeuten: i) DMF, PyBOP, DIPEA, 0 °C→RT, 20 h, 47%; ii) 1.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , TFA, RT, 24 h; 2. Propan-2-ol, HCl, 87%.

Um auszuschließen, dass die Affinität der Paullone durch die Anknüpfung der *spacer*-Einheit in Position 5 beeinträchtigt wird, sollten auch immobilisierbare Paullone mit einer *spacer*-Kette in Position 12 synthetisiert werden. Für diese Synthesen wurde eine Substanzprobe des Edukts **33** von KORN zur Verfügung gestellt. Es wurden Reaktionsbedingungen gewählt, die beim *N*<sup>6</sup>-substituierten Paullon **35g** zu einem disubstituierten Nebenprodukt geführt hatten. Auch die Umsetzung von **33** mit **65** zu **70** in DMF mit Cäsiumcarbonat war nicht möglich. Dünnschichtchromatographisch konnte zwar nachgewiesen werden, dass sich das Edukt umgesetzt hatte, Produkt konnte mittels Säulenchromatographie jedoch nicht isoliert werden. Auch bei dieser Synthesesequenz war eine Hydrazinolyse der Amin-Schutzgruppe von **70** geplant, was zur Struktur **71** geführt hätte (Schema 7-4).

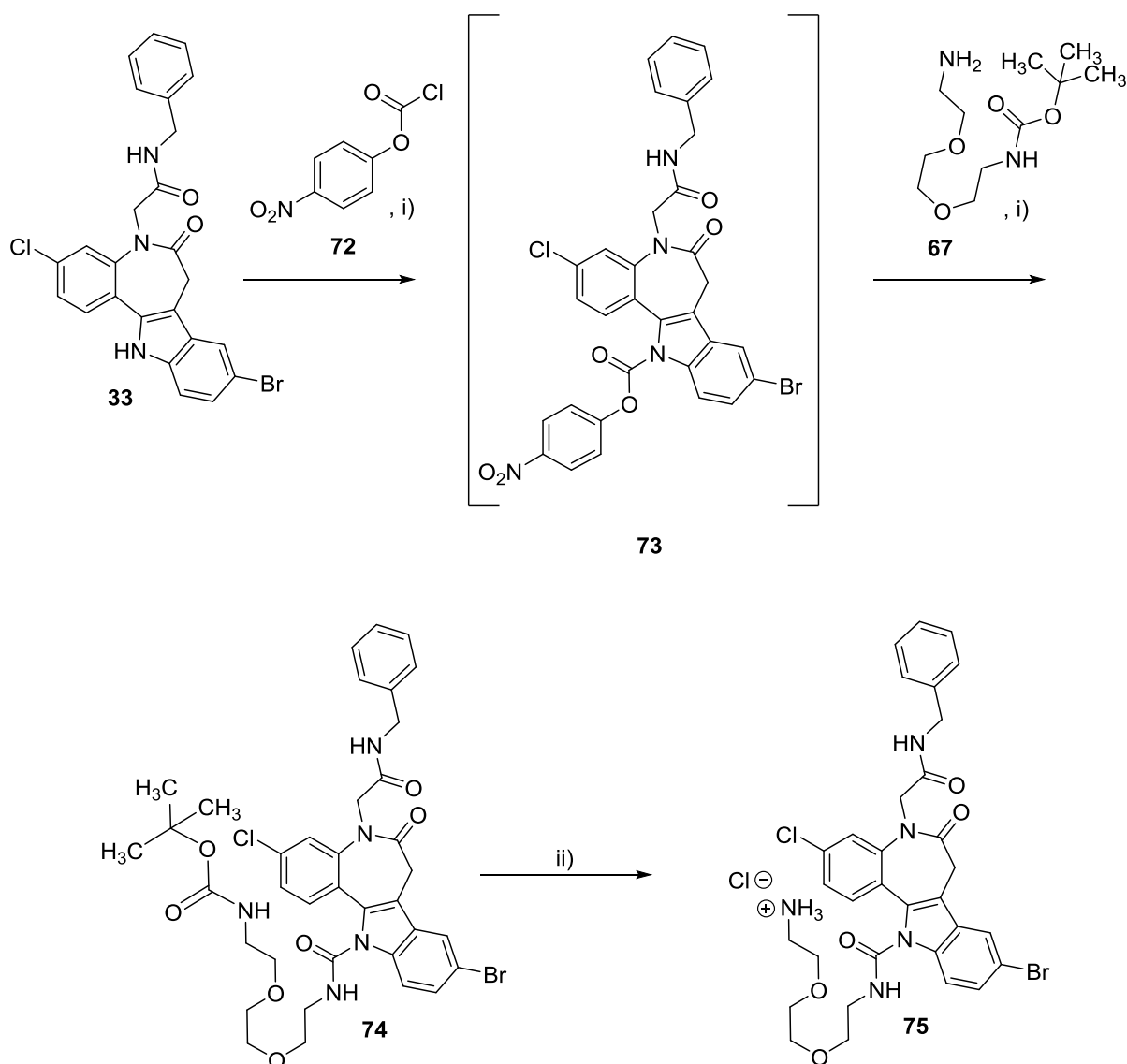


Schema 7-4: Versuch zur Synthese des Paullon **71** für eine Affinitätsuntersuchung. Reaktionsbedingungen und Reagenzien: i) DMF, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Reflux. Für den zweiten Reaktionsschritt war eine Hydrazinolyse mit Hydrazin-Monohydrat in Methanol geplant.

Als Alternative wurde eine Synthesevorschrift von GREENWALD *et al.*<sup>158</sup> verwendet, um den Indol-Stickstoff *N*<sup>12</sup> für eine Immobilisierung verfügbar zu machen (Schema 7-5). GREENWALD *et al.* synthetisierten mit dieser Methode Prodrugs des Alsterpaullons auf der Basis von Polyethylenglycolen. Hierzu wurde zunächst Verbindung **33** in THF mit DMAP als Hilfsbase und 4-Nitrophenylkohlen säureesterchlorid (**72**) zur Zwischenstufe **73** umgesetzt, die nicht

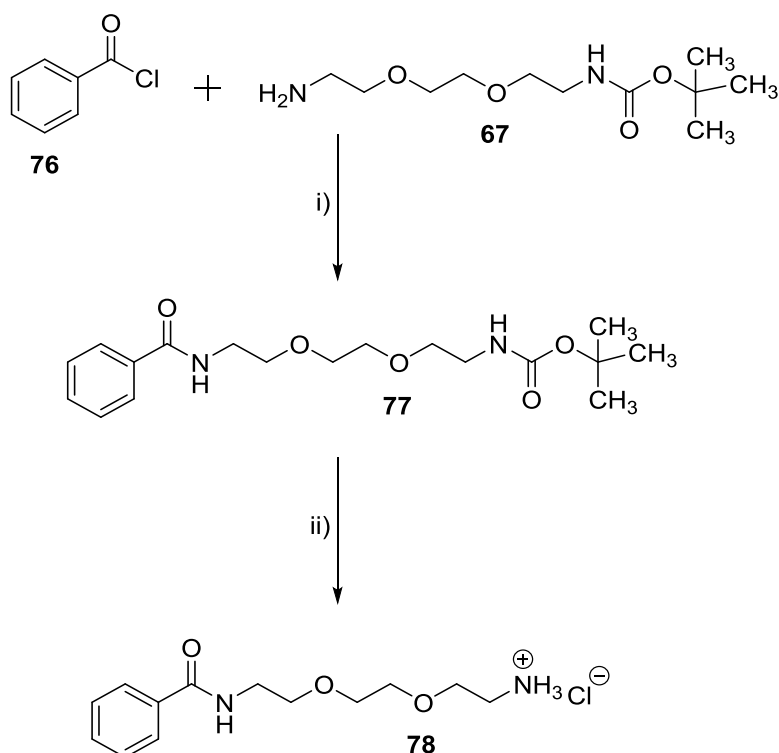


isoliert wurde. Durch Zugabe des Amins **67** im Überschuss wurde das gewünschte Produkt **74** gebildet und nach säulenchromatographischer Reinigung für die folgende Synthese eingesetzt. Dazu wurde **74** in getrocknetem Dichlormethan gelöst und die Boc-Gruppe mit Trifluoressigsäure abgespalten. Durch eine anschließende Hydrochlorid-Fällung in Diethylether wurde **75** erhalten.



Schema 7-5: Synthese des Paullons **75** zur Affinitätsuntersuchung. Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeuten: i) THF, DMAP, RT, über Nacht, 28%; ii) 1. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TFA, RT, 35 min; 2. Propan-2-ol, HCl, 80%.

Abschließend wurde eine einfache aromatische Verbindung als immobilisierbare Kontrollsubstanz für die Affinitätsuntersuchung synthetisiert (Schema 7-6). Ziel dabei war es, Proteine zu identifizieren, die durch hydrophobe Wechselwirkungen unspezifisch an die immobilisierten Strukturen binden. Die Darstellung dieser Kontrollverbindung erfolgte nach einer abgewandelten Patentvorschrift von SCHUSTER *et al.*<sup>159</sup> ausgehend von Benzoylchlorid (**76**), welches mit dem Amin **67** in getrocknetem Dichlormethan unter Zusatz der Hilfsbase Triethylamin zur Verbindung **77** umgesetzt wurde. In getrocknetem Dichlormethan konnte die Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure abgespalten und das Produkt **78** als Hydrochlorid aus Diethylether gewonnen werden.



Schema 7-6: Synthese der Kontrollverbindung **78** zur Affinitätsuntersuchung. Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Ausbeuten: i)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , TEA, RT, 2 h, 85%; ii) 1.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , TFA, RT, 24 h; 2. Propan-2-ol, HCl, 93%.

Die einzelnen Verbindungen, die für eine Affinitätsuntersuchung mit *Trypanosoma brucei*-Homogenat vorgesehen sind, sollten der Arbeitsgruppe von COMINI zur Durchführung der Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden.

## 8. Zusammenfassung

Spezies aus den Gattungen *Leishmania* und *Trypanosoma* sind für die vernachlässigten Tropenkrankheiten Leishmaniose, Chagas und Afrikanische Schlafkrankheit verantwortlich.<sup>4, 9</sup> Als Schlüsselenzym im Redox-Metabolismus dieser Parasiten kommt der Trypanothionsynthetase (TryS) große Bedeutung zu.<sup>51, 79</sup> Das Enzym stellt dabei ein relevantes *target* dar, das von Paullonen adressiert wird.<sup>58, 80</sup> Im Rahmen der Arbeit über neue *N*-substituierte 3-Chlorkenpaullone als Wirkstoffe gegen Trypanosomen, wurden Strukturvariationen an 3-Chlorkenpaullonen durchgeführt. Das Strukturdesign wurde durch *docking*-Studien unterstützt. Anschließende biologische Testungen lieferten Ergebnisse zur Aktivität der neuen Verbindungen. Dabei wurden 3-Chlorkenpaullone identifiziert, die sowohl gute Aktivität gegen das enzymatische intrazelluläre *target* als auch gegen *in vitro* kultivierte Parasiten aufweisen (Abbildung 8-1). Die Paullone **36y** und **36s** stellten sich als besonders aktive Verbindungen heraus. **36y** hemmt die Proliferation von *Trypanosoma brucei brucei* mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 200 nM und **36s** inhibiert die *Leishmania infantum*-TryS mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 390 nM. Daneben zeigten 9 der 11 Testverbindungen der Grundstruktur **35** Hemmwirkung gegenüber der *Trypanosoma cruzi*-TryS mit IC<sub>50</sub>-Werten von 9–11 µM.

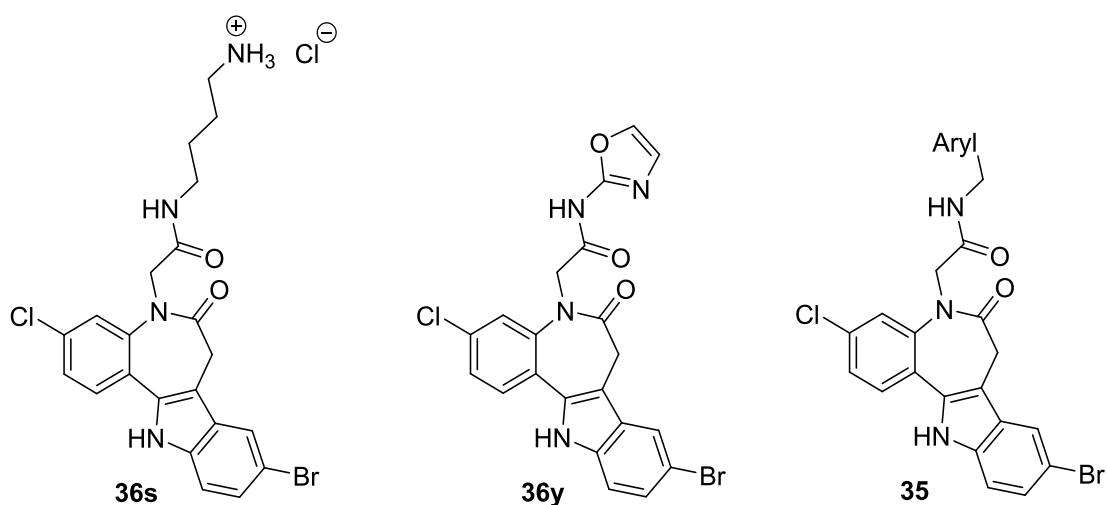


Abbildung 8-1: Neue *N*<sup>6</sup>-substituierte 3-Chlorkenpaullone mit biologischer Aktivität. **36s** inhibiert die *Leishmania infantum*-TryS mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 390 nM und **36y** ist ein Hemmstoff des Parasiten *Trypanosoma brucei brucei* mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 200 nM. Unter den Verbindungen **35** wurden *Trypanosoma cruzi*-TryS-Inhibitoren mit IC<sub>50</sub>-Werten im einstelligen oder niedrig zweistelligen mikromolaren Bereich identifiziert.

Für die neuen Paullone mit guter antiparasitärer Aktivität gegen den Modellparasiten *Trypanosoma brucei brucei* konnte keine entsprechende Inhibition der isolierten *Trypanosoma brucei*-TryS nachgewiesen werden, was die Vermutung nahelegt, dass die Verbindungen ein

weiteres parasitäres *target* hemmen. Um das unbekannte parasitäre *target* zu identifizieren, wurde ein Ethylenglycol-*spacer* am Paullon angebracht. Ziel dabei war es, das Paullon über diesen *spacer* an Matrices zu binden, um im Anschluss Affinitätsexperimente mit *T. brucei brucei*-Homogenat durchzuführen. Diese Affinitätsuntersuchungen zielten darauf ab, das unbekannte *target* der Verbindungen zu identifizieren. Die durchgeführten Synthesen ergaben die Strukturen **69** und **75** (Abbildung 8-2). **75** weist dabei eine Partialstruktur eines besonders potent antiproliferativen  $N^5$ -substituierten Paullons auf, das bereits von KORN beschrieben wurde.<sup>154</sup>

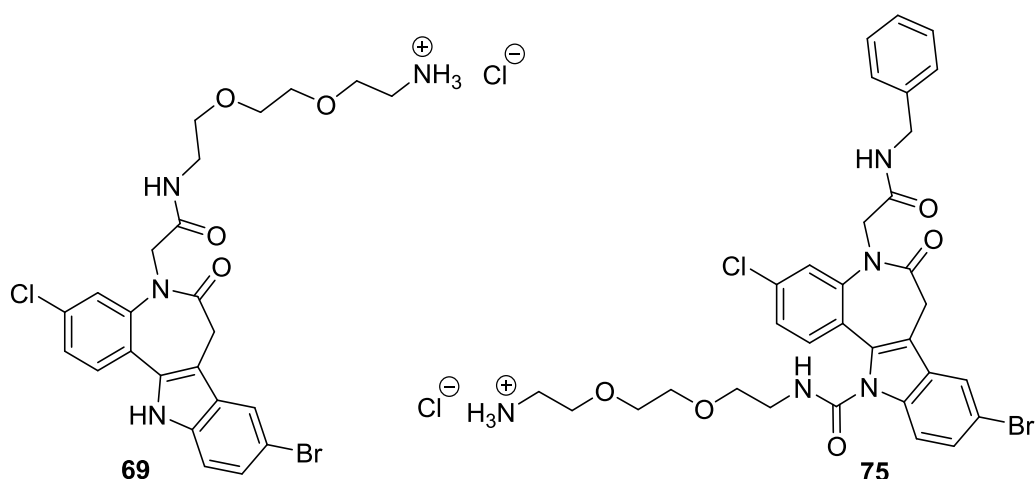


Abbildung 8-2: Paullone zur Affinitätsuntersuchung. Die Paullone **69** und **75** sind mit einem Ethylenglycol-*spacer* verküpft und können über die terminale Aminogruppe an Matrices für Affinitätsuntersuchungen gebunden werden.

In einem weiteren Teilprojekt konnten Paullone unter Verwendung von  $\text{LiAlH}_4$  zu Strukturen umgesetzt werden, bei denen das Lactam des Benzazepin-Rings zum sekundären Amin reduziert wurde (Abbildung 8-3).

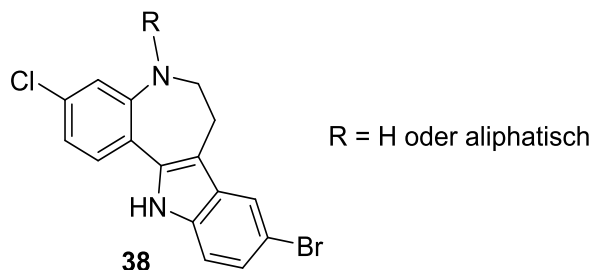


Abbildung 8-3: Reduktionsprodukte **38**. Die Verbindungen wurden bei der Reaktion von 3-Chlorkenpaullonen mit  $\text{LiAlH}_4$  erhalten.

Die Untersuchungen zu den physikochemischen Eigenschaften der Verbindungen machen deutlich, dass die neuen 3-Chlorkenpauillone durch eine schlechte thermodynamische Löslichkeit gekennzeichnet sind. Für die schlechte Löslichkeit kann neben den relativ großen relativen Molmassen der große Anteil aromatischer Strukturen verantwortlich gemacht werden. Zielführend für die Weiterentwicklung der Strukturen wird es sein, die *N*-substituierten 3-Chlorkenpauillone im Hinblick auf die genannten strukturellen Parameter zu optimieren, ohne dabei die biologische Aktivität zu vermindern.

## 9. Summary

Species of the genera *Leishmania* and *Trypanosoma* are responsible for the tropical neglected diseases leishmaniosis, Chagas disease and African sleeping sickness.<sup>4, 9</sup> The trypanothione synthetase (TryS) plays an important role as a key enzyme in the redox metabolism of these parasites.<sup>51, 79</sup> The enzyme is a relevant target which is addressed by paullones.<sup>58, 80</sup> As part of the work on new *N*-substituted 3-chlorokenpaullones as drugs substances against trypanosomes, various structural variations of 3-chlorokenpaullone were carried out. Drug design was supported by docking studies. The subsequent biological evaluation provided results on the activity of the new compounds. Some of the new 3-chlorokenpaullones showed good activity towards the enzymatic target and against *in vitro* cultivated parasites (figure 9-1). The paullones **36y** and **36s** were identified as particularly active compounds. **36y** inhibits the proliferation of *Trypanosoma brucei brucei* with an  $EC_{50}$  value of 200 nM and **36s** inhibits the *Leishmania infantum* TryS with an  $IC_{50}$  value of 390 nM. Moreover, 9 out of 11 compounds **35** display activity towards *Trypanosoma cruzi* TryS with  $IC_{50}$  values of 9–11  $\mu$ M.

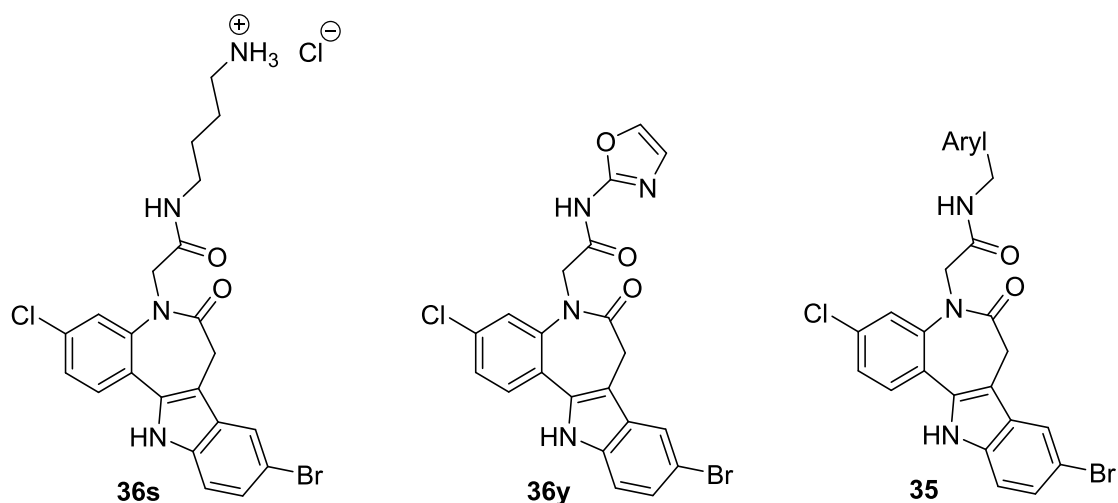


Figure 9-1: New *N*-substituted 3-chlorokenpaullones with biological activity. **36s** inhibits *Leishmania infantum* TryS with an  $IC_{50}$  value of 390 nM and **36y** represents an antiparasitic agent towards *Trypanosoma brucei brucei* with an  $EC_{50}$  value of 200 nM. Among compounds **35** *Trypanosoma cruzi* TryS inhibitors with  $IC_{50}$  values in the single digit or low double-digit micromolar range were identified.

For paullones with good antiparasitic activity against the model parasite *Trypanosoma brucei brucei* no adequate inhibition of the isolated *Trypanosoma brucei* TryS was detectable, suggesting an additional parasitic target. To identify the unknown parasitic target, an ethylene glycol spacer was attached to the paullone. The idea of the so-designed structure

was to connect the paullone via the spacer to matrices in order to perform affinity experiments with *Trypanosoma brucei brucei* homogenate. These experiments were intended to provide the unknown target of the compounds. The syntheses furnished the compounds **69** and **75** (figure 9-2). **75** includes a partial structure of a potent antiproliferative *N*<sup>6</sup>-substituted paullone, which was previously published by KORN.<sup>154</sup>

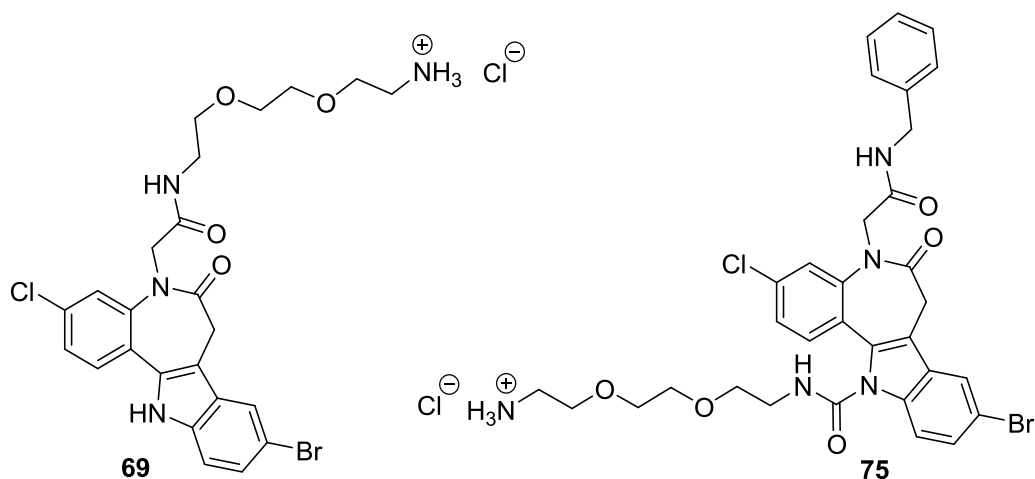


Figure 9-2: Paullones for affinity experiments. The paullones **69** and **75** comprising an ethylene glycol spacer are designed to be connected via the terminal amine to matrices in order to run affinity experiments.

In a further subproject, paullones were converted by  $\text{LiAlH}_4$  to structures in which the lactam of the benzazepine was reduced to a secondary amine (figure 9-3).

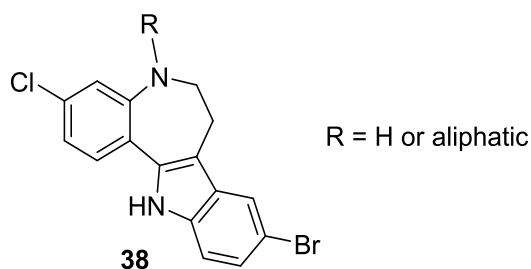


Figure 9-3: Reduction products **38**. The compounds were obtained by the reaction of 3-chlorokenpaullones with  $\text{LiAlH}_4$ .

Studies on physicochemical properties show that the new 3-chlorokenpaullones are characterized by poor thermodynamic solubilities. Besides the high relative molecular mass, the aromatic systems are probably responsible for the low thermodynamic solubility. Therefore the further structure development of the 3-chlorokenpaullones will focus on improvement of the physicochemical parameters without reduction of biological activity.

## 10. Experimenteller Teil

### 10.1 Protein-Liganden-*docking*

Die zu untersuchenden Liganden wurden mit der Software MOE<sup>95</sup> konstruiert. Funktionelle Gruppen, die bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 geladen vorliegen, wurden protoniert. Die Liganden wurden mit dem Programm energieminiert und als mol2-Dateien gespeichert. Für das *docking* wurde die Software GOLD (GOLD Suite v 5.2.2)<sup>91</sup> mit Hermes als Benutzeroberfläche verwendet. Die Arbeit wurde auf einem Windows-gestützten Rechner durchgeführt. Für die Studien wurde mit der Hilfsfunktion *wizard* gearbeitet. Zunächst wurde das Modell des TryS-Proteins hochgeladen und anschließend wurden fehlende Wasserstoffatome ergänzt. Wassermoleküle waren in den verwendeten Modellen nicht vorhanden. Der enthaltene Ligand wurde extrahiert und das Modell wurde als mol2-Datei gespeichert. Die Bindungsstelle für die Untersuchung wurde mit 10 Å um den entfernten Liganden definiert. Als Template diente das *chemscore kinase*-Template, da der ATP-Bindespalt der TryS dem einer Kinase gleicht<sup>96</sup> und weil beide Enzymklassen durch Phosphatgruppen-Übertragung ähnliche biochemische Reaktionen katalysieren. Die energieminierten Liganden wurden anschließend hochgeladen und die *GA run*-Funktion auf 20 Läufe eingestellt, um 20 Posen zur abschließenden Bewertung zu erhalten. Zur Einstufung der Posen wurde die *scoring*-Funktion *ChemPLP* gewählt. Zudem wurde die *allow early termination* deaktiviert, um den vorzeitigen Abbruch der Untersuchung zu verhindern. Die *search efficiency* wurde auf 200% erhöht. Die *docking*-Ergebnisse wurden als mol2-Dateien gespeichert, wobei alle 20 Posen in einer Datei abgelegt wurden (*save solution to one file*). Zur besseren graphischen Darstellung wurde die Funktion *save lone pairs* deaktiviert. In der Regel wurde bei den *docking*-Untersuchungen ohne *constraints* gearbeitet. Nur bei der Studie der Verbindung **36d** wurden Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und PHE586 vorgegeben. Die 20 Posen, die nach jedem *docking*-Lauf erhalten wurden, wurden anhand visueller Kriterien bewertet. So wurden die Posen selektiert, die bereits publizierten Posen ähnlich sind<sup>96</sup> oder die beobachtete inhibitorische Eigenschaften erklären können.<sup>80</sup> Einzelne Posen wurden im Anschluss graphisch dargestellt.<sup>161</sup> Die in den Abbildungen gezeigten Aminosäuresequenzen sind in der Regel nicht vollständig, das heißt, dass einzelne Aminosäuren ausgeblendet wurden, um den ausgewählten Bindungsmodus des Liganden besser betrachten zu können.



## 10.2 Geräte, Methoden und eingesetzte Chemikalien

### Waagen

Sartorius Entris224I-1S und Sartorius 1264 MP, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland.

### Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigfolien Polygram<sup>®</sup> Sil G/UV<sub>254</sub> 40 x 80 mm, 0.2 mm Kieselgelschicht mit Fluoreszenzindikator, Fa. Machery-Nagel, Düren. Die Detektion erfolgte bei 254 und 366 nm unter Verwendung eines CAMAG UV-Kabinett 4, Muttenz, Schweiz. In der Regel wurden Gemische aus Ethylacetat und Petrolether als Elutionsmittel verwendet, gegebenenfalls unter Zusatz von Eisessig bei sauren Analyten oder Ammoniak bei basischen Analyten.

### Elementaranalytik

CE Instruments Flash EA<sup>®</sup> 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest, San Jose, CA, USA; Angabe der Werte in Prozent.

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

LaChrome Elite<sup>®</sup> (isokratische Elution): Pump L-2130, Column Oven L-2300, Autosampler L-2200, Diode Array Detector L-2450, OrganizerBox L-2000, Trennsäule Merck LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, LiChrospher<sup>®</sup> 100, RP-18, 5 µM, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland.

LaChrom Elite<sup>®</sup> (Gradientenelution): Pump L-2130, Autosampler L-2200, UV Detector L-2400, OrganizerBox L-2000, Trennsäule Merck LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18, 5 µM, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland.

Probenvorbereitung und Injektion: Etwa 0.5 mg der Probe wurden in 350 bis 400 µL DMSO gelöst und durch einen Mini-UniPrep<sup>®</sup>-Filter (Whatman) filtriert. Es wurden bis zu 17 µL dieser Lösung injiziert, wobei das Absorptionsmaximum zwischen 300 und 1500 mAU liegen sollte.

Elution (isokratische Elution): Flussrate 1.000 mL/min, 15 min Gesamtlaufzeit, 40 °C Säulentemperatur,  $t_{M+S}$  = Bruttoretentionszeit,  $t_M$  = Totzeit, angestrebte Bruttoretentionszeit

2–8 min; Elution (Gradientenelution): Acetonitril-Wasser-Gemische, Flussrate 1.000 mL/min, 20 min Gesamtlaufzeit,  $t_{M+S}$  = Bruttoretentionszeit,  $t_M$  = Totzeit, Verlauf der Gradientenelution (Methode A): Acetonitrilkonzentration 0–13 min: 10→90% (linear), 13–20 min: 90%; Verlauf der Gradientenelution (Methode B): Acetonitrilkonzentration 0–2 min: 10%, 2–12 min: 10→90% (linear), 12–20 min: 90%.

Elutionsmittel (isokratische Elution): Acetonitril-Wasser- oder Acetonitril-Puffergemische in dem angegebenen Verhältnis, Herstellung des Puffers (Triethylammoniumsulfat-Puffer pH 2.7): Eine Lösung aus bidest. Wasser (980.0 mL), Triethylamin (20.0 mL) und Natriumhydroxid (242 mg) wird mit konz. Schwefelsäure auf pH 2.7 eingestellt; Elutionsmittel (Gradientenelution): Acetonitril-Wasser-Gemische.

Detektion (isokratische Elution): DAD bei 254 nm und 280 nm, falls keine spezifische Wellenlänge angegeben ist, Angabe der Absorptionsmaxima; Detektion (Gradientenelution): UV bei 254 nm.

Auswertung: 100%-Methode nach Peakflächenintegration, 0–1.6 min Integrationsausschluss, Threshold 1000 AU, Angabe von Bruttoretentionszeit ( $t_{M+S}$ ) und Totzeit ( $t_M$ ), Absorptionsmaxima ( $\lambda_{max}$ ) aus den UV-Spektren des DAD, EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3 (verwendete Software für Löslichkeitsuntersuchungen), EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.3.2 SP2 (verwendete Software für Reinheitsuntersuchungen).

### pH-Meter

632 pH-Meter, Glaselektrode, Fa. Metrohm GmbH und Co. KG, Filderstadt, Deutschland.

### Infrarot-Spektroskopie

Als KBr-Presslinge oder auf NaCl-Scheibe; Thermo Nicolet FT-IR 200, Fa. Thermo Nicolet, Madison, WI, USA.

### NMR-Spektroskopie

Bruker Avance DRX-400 ( $^1\text{H}$ -NMR: 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR: 101 MHz), Bruker Avance III-400 ( $^1\text{H}$ -NMR: 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR: 101 MHz), Bruker Avance 600 ( $^1\text{H}$ -NMR: 600 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR: 151 MHz), Fa. Bruker, Billerica, MA, USA; Institut für Chemie NMR-Laboratorien der chemischen Institute der TU Braunschweig.

Lösungsmittel: DMSO- $d_6$ .

Interner Standard: Tetramethylsilan, chemische Verschiebung in ppm nach  $\delta_{\text{TMS}}$ -Skala.

$^1\text{H}$ -NMR: Angabe des Protonenverhältnisses mittels Integration.

$^{13}\text{C}$ -NMR: Aufnahme der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren mit  $^1\text{H}$ -Breitbandentkopplung sowie routinemäßig mit  $^{13}\text{C}$ -135DEPT-Experimenten; Angabe 2C: Überlagerung zweier magnetisch äquivalenter Kohlenstoffatome oder zweier sehr eng zusammenstehender Signale.

Signalmultiplizitäten und weitere Angaben: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), m (Multipllett) und deren Multiplizitäten wie dd (Dubletts vom Dublett); b vorangeführt bei Signalverbreiterung, beispielsweise bs für breites Singulett.

### Massenspektrometrie

Finnigan-MAT 95, Fa. Thermo Finnigan MAT, Bremen, Deutschland; LTQ-Orbitrap Velos, Fa. ThermoFischer Scientific, Bremen, Deutschland, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, TU Braunschweig.

Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV; Hochaufgelöste Elektronenstoß-Ionisation Massenspektren (HRMS EI): Interner Massenstandard Perfluorkerosin; Elektronenspray-Ionisation (ESI)-MS: In Methanol unter Zusatz von Tetradecyltrimethylammoniumbromid (0.1 mg/mL) zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/mL}$  verdünnt, Zufuhr durch Direktinfusion, Sprühpotential im positiven Modus: 2.3–2.8 kV.

### Schmelz- und Zersetzungstemperatur

In offenen Glaskapillaren in einem Barnstead Electrothermal IA9100, Fa. Electrothermal, Staffordshire, Großbritannien.

### Inkubation zur Bestimmung der thermodynamischen Löslichkeit

IKA® KS 3000 ic control; Externer Kühler: KV 600 digital - 230 V, IKA®-Werke, Staufen, Deutschland.

### Kinetische Löslichkeit

NEPHELOstar Plus BMG LABTECH, Offenburg, Deutschland in Verbindung mit der Benutzersoftware Omega 5.11 und der Auswertungssoftware MARS 3.20.

### Destillation unter vermindertem Druck

Hei-VAP Advantage, Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland; Membran-Vakuumpumpe MZ 2C, Fa. Vacuubrand, Wertheim, Deutschland.

### Trocknen

Baron-Probentrockner, Fa. Lothar Baron Laborgeräte, Reichenau, Deutschland; Ölgedichtete Vakuumpumpe ADEA 71 N 4, Fa. Leybold, Köln, Deutschland.

Trockenschrank Avantgarde.Line, Modell ED 115, Fa. Binder, Tuttling, Deutschland.

### Trocknen von Lösungsmitteln

DMF wurde in Uvasol<sup>®</sup>-Qualität eingesetzt. Soweit nicht anders beschrieben wurden nicht getrocknete Lösungsmittel verwendet. Lösungsmittel wurden unter Anlehnung an publizierte Methoden<sup>162</sup> wie folgt getrocknet.

Dichlormethan: Dichlormethan (1 L) wurde mit Calciumhydrid (2–3 g) versetzt und unter Feuchtigkeitsausschluss refluxiert (4 h). Anschließend wurde das getrocknete Lösungsmittel durch Destillation gewonnen. Verbleibendes Calciumhydrid wurde schrittweise durch Zugabe von Ethanol, Methanol und dann Wasser deaktiviert. Das getrocknete Lösemittel wurde über Molekularsieb 3 Å gelagert.

Tetrahydrofuran: Das auf Peroxide geprüfte Lösungsmittel (1 L) wurde über Kaliumhydroxidplättchen (15 g) über Nacht vorgetrocknet. Das abdekantierte Lösungsmittel wurde mit Calciumhydrid (2–3 g) versetzt und unter Feuchtigkeitsausschluss refluxiert (4 h). Anschließend wurde das getrocknete Lösungsmittel durch Destillation gewonnen. Verbleibendes Calciumhydrid wurde schrittweise durch Zugabe von Ethanol, Methanol und dann Wasser deaktiviert. Das getrocknete Lösungsmittel wurde über Kaliumhydroxidplättchen gelagert. Achtung: Vor jedem Gebrauch auf Peroxide prüfen!

Toluen: Das Lösungsmittel wurde mittels azeotroper Destillation unter Verwendung eines Wasserabscheiders vorgetrocknet. Das vorgetrocknete Lösungsmittel wurde mit Calciumchlorid versetzt (10 g) und unter Feuchtigkeitsausschluss refluxiert (1–2 h). Das getrocknete Lösungsmittel wurde anschließend durch Destillation gewonnen und über Molekularsieb 4 Å gelagert.

Aceton: Aceton (500 mL) wurde mit wasserfreiem CaSO<sub>4</sub> (20 g) versetzt und refluxiert (1 h). Das getrocknete Lösungsmittel wurde mittels Destillation unter Feuchtigkeitsausschluss gewonnen und über Molekularsieb 4 Å gelagert.

Dimethylsulfoxid: Das Lösungsmittel (500 mL) wurde über wasserfreiem CaSO<sub>4</sub> (20 g) über Nacht vorgetrocknet. Das Lösungsmittel wurde abdekantiert, mit Calciumhydrid (2–3 g) versetzt und unter Feuchtigkeitsausschluss refluxiert (4 h). Das getrocknete Lösungsmittel wurde anschließend durch Destillation gewonnen und über Molekularsieb 4 Å gelagert. Verbleibendes Calciumhydrid wurde schrittweise durch Zugabe von Ethanol, Methanol und dann Wasser deaktiviert.

#### Bezug der Ausgangschemikalien

Edukte und Chemikalien wurden für die Synthese bei Acros Organics (Geel, Belgien), Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) und Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland) erworben. Für die biologischen und biochemischen Experimente wurden die Chemikalien, wenn nicht anders beschrieben, bei Sigma Aldrich erworben.

## 10.3 Synthesen

### AAV1: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Paullon-*N*<sup>6</sup>-acetamiden

Unter Stickstoff werden zu einer eisgekühlten Lösung aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 294 mg, 700 µmol) in DMF (1 mL) DIPEA (511 µL, 2.93 mmol) und PyBOP (442 mg, 850 µmol) hinzugegeben. Der Ansatz wird 20 min im Eisbad gerührt und anschließend wird das entsprechende Amin (830 µmol) zugesetzt. Die Reaktionslösung wird mit Argon überschichtet, verschlossen und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wird Ethylacetat (100 mL) zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Falls es zur Entstehung eines Niederschlages kommt, wird dieser abfiltriert. Die Lösung wird nacheinander mit 0.1 molarer wässriger Salzsäure, 0.1 molarer wässriger Natriumhydroxidlösung und Wasser (jeweils 100 mL) gewaschen. Zur besseren

Phasentrennung erfolgt die Zugabe von Natriumchlorid. Die gesammelten organischen Phasen werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und anschließend unter vermindertem Druck eingeengt. Der Rückstand wird mit dem Filterkuchen vereinigt und mit dem jeweils angegebenen Verfahren gereinigt.

AAV2: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von  $N^5$ -substituierten Paullonen

Gearbeitet wird unter Stickstoff. Eine Suspension aus 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**32**, 362 mg, 1.00 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (25 mL) wird mit Kalium-*tert*-butylat (134 mg, 1.20 mmol) versetzt, wobei eine rote Lösung entsteht. Der Reaktionsansatz wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Alkylbromid (1.00 mmol) zum Ansatz hinzugegeben wurde, wird über Nacht bei Raumtemperatur weiter gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert, der Rückstand in Dichlormethan (100 mL) aufgenommen und mit Wasser (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wird erneut unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand mit dem angegebenen Verfahren gereinigt.

AAV3: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von  $N^{12}$ -substituierten Paullonen

Eine Lösung aus 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**32**, 307 mg, 850  $\mu$ mol) in getrocknetem Aceton (100 mL) wird mit Kaliumhydroxid (33.7 mg, 600  $\mu$ mol) versetzt und die Lösung 1 h im Eisbad gerührt. Der Ansatz wird mit dem entsprechenden Alkylbromid (10.0 mmol) versetzt, mit Argon überschichtet und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung auf Wasser (100 mL) gegeben und die entstehende Suspension filtriert. Der gewonnene Feststoff wird säulenchromatographisch gereinigt.

AAV4: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Abspaltung einer Boc-Schutzgruppe

Unter Stickstoff wird zu einer Lösung des schutzgruppentragenden Paullons (350  $\mu$ mol) in getrocknetem Dichlormethan (50 mL) Trifluoressigsäure (9 mL) hinzugegeben und es wird für 24 h gerührt. Das organische Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und der verbleibende Feststoff in Propan-2-ol (3 mL) aufgenommen. Es werden 10 Tropfen einer 5 M propan-2-olischen HCl (4.20 mL 36% HCl und Propan-2-ol ad 10.0 mL) hinzugegeben. Zu der Lösung oder Suspension wird unter Rühren Diethylether (50 mL)

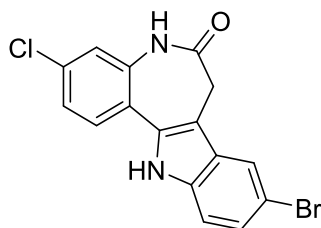
hinzugefügt und die resultierende Suspension für 1 h zum Reflux erhitzt. Die Suspension wird über Nacht im Kühlschrank gelagert. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

AAV5: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von zyklischen Aminen mit Ethylphthalimid-Seitenkette

Zu einer Lösung aus dem entsprechenden sekundären Amin (10.0 mmol) in Acetonitril (25 mL) wird unter Rühren  $K_2CO_3$  (1.67 g, 12.0 mmol) und *N*-(2-Bromethyl)phthalimid (2.16 g, 8.50 mmol) hinzugegeben. Die Suspension wird 4 h bei 100 °C gerührt. Anschließend wird das organische Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Niederschlag in Dichlormethan gelöst (100 mL). Die organische Phase wird mit Wasser (100 mL) gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der resultierende Feststoff wird säulenchromatographisch unter Verwendung des angegebenen Lösungsmittels gereinigt.

AAV6: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von zyklischen Aminen mit Aminoethyl-Seitenkette

Eine Suspension aus dem entsprechenden geschützten Amin (3.80 mmol) und Ethanol (15 mL) wird mit Hydrazin-Monohydrat (775  $\mu$ L, 15.0 mmol) versetzt und 1 h zum Rückfluss erhitzt. Der resultierende Niederschlag wird abfiltriert und verworfen. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wird in Dichlormethan (50 mL) gelöst, wobei ungelöster Feststoff abfiltriert und verworfen wird. Die organische Phase wird unter vermindertem Druck eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wird als Rohprodukt für die Folgesynthese eingesetzt.

9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (32)

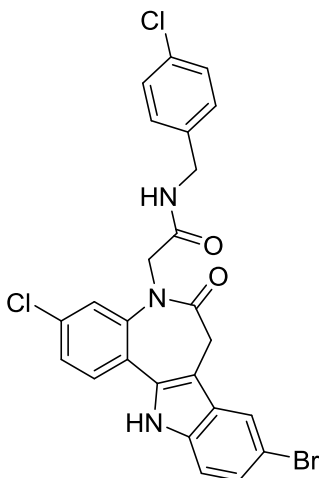
Eine Suspension aus 8-Chlor-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**42**, 211 mg, 1.01 mmol), 4-Bromphenylhydrazin Hydrochlorid (298 mg, 1.33 mmol) und wasserfreiem Natriumacetat (113 mg, 1.38 mmol) in Eisessig (10 mL) wurde für 1 h bei 70 °C gerührt. Nach Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure (100 µL), wurde 75 min bei 70 °C weiter gerührt. Der Ansatz wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und auf eine 5%ige wässrige Natriumacetatlösung (20 mL) gegeben. Der über Nacht im Kühlschrank entstandene orange Feststoff wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein gelber Feststoff erhalten (151 mg, 42%).

Zers.: 247–249 °C (Lit.<sup>163</sup>: ab 348 °C); IR (KBr): 3223 cm<sup>-1</sup> (NH), 1647 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 11.87 (s, 1H, Indol-NH), 10.23 (s, 1H, Lactam-NH), 7.93 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.37 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.31 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.29 (dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 3.56 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 31.4 (CH<sub>2</sub>); 113.5, 120.6, 121.2, 123.5, 124.8, 128.2 (CH); 107.4, 111.8, 121.6, 128.6, 132.4, 133.0, 136.1, 136.8, 171.4 (C); CHN: ber. C 53.14, H 2.79, N 7.75, gef. C 53.21, H 2.77, N 7.51; C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>BrClN<sub>2</sub>O (361.62); MS (EI): *m/z* (%): 362 [M]<sup>++</sup> (100), 333 [M<sup>++</sup>-29] (62); HPLC (isokratisch) 98.7% bei 254 nm, 98.0% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 5.88 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 50:50); λ<sub>max</sub>: 231 nm, 322 nm, 383 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 95.4% bei 254 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 12.02 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.25 min.

Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>163</sup>



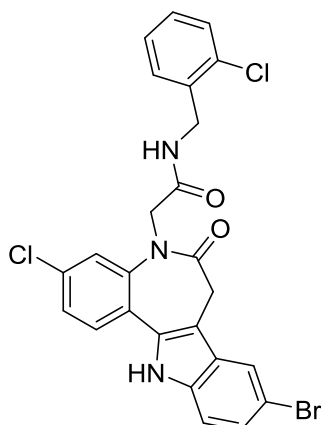
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(4-chlor-benzyl)acetamid (**35a**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 293 mg, 698  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (511  $\mu\text{L}$ , 2.93 mmol), PyBOP (443 mg, 851  $\mu\text{mol}$ ) und 4-Chlorbenzylamin (100  $\mu\text{L}$ , 827  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol wurde ein farbloser Feststoff erhalten (114 mg, 30%).

Zers.: ab 305 °C; IR (KBr): 3316  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1657  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1639  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.69 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, -NH), 7.97 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.67 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.49 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.39–7.35 (m, 2H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.29–7.26 (m, 2H, ArH), 4.31 (bs, 4H, - $\text{N}^{\text{F}}$ -CH<sub>2</sub> und -CH<sub>2</sub>), 3.99 und 3.12 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.1, 41.4, 53.5 (CH<sub>2</sub>); 113.6, 120.7, 124.0, 124.8, 125.1, 128.1 (2C); 128.5, 128.8 (2C) (CH); 109.3, 111.8, 123.9, 127.7, 128.8, 131.2, 132.4, 135.9, 138.3, 140.9, 168.4, 170.2 (C); CHN: ber. C 55.27, H 3.34, N 7.74, gef. C 55.28, H 3.39, N 7.47; C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (543.24); MS (EI):  $m/z$  (%): 542.9 [ $\text{M}]^{+\bullet}$  (24), 401.9 [ $\text{M}^{+\bullet}-141$ ] (100); HPLC (isokratisch): 99.2% bei 254 nm, 99.5% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 5.40 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/H<sub>2</sub>O = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 234 nm, 318 nm; HPLC (Gradient-Methode A): 98.5% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 13.14 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.25 min.

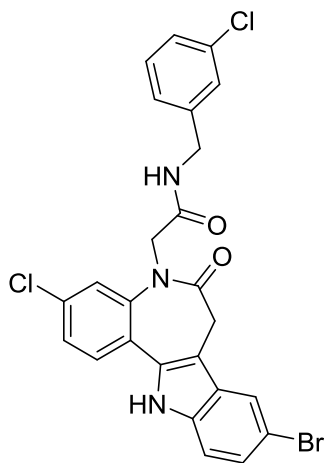
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(2-chlor-benzyl)acetamid (**35b**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 293 mg, 698  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (511  $\mu\text{L}$ , 2.93 mmol), PyBOP (441 mg, 847  $\mu\text{mol}$ ) und 2-Chlorbenzylamin (100  $\mu\text{L}$ , 827  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Methanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (159 mg, 42%).

Zers.: ab 345 °C; IR (KBr): 3422  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3312  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3262  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1654  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.70 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 1H, -NH), 7.97 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.69 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.49 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.47–7.43 (m, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.40–7.36 (m, 1H, ArH), 7.35–7.28 (m, 3H, ArH), 4.38 (bs, 4H, - $N^6$ -CH<sub>2</sub> und -CH<sub>2</sub>), 4.01 und 3.12 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.2, 40.1, 53.5 (CH<sub>2</sub>); 113.6, 120.8, 124.0, 124.9, 125.2, 127.1, 128.6 (3C), 129.1 (CH); 109.4, 111.9, 124.1, 127.8, 131.9, 132.5, 133.0, 136.0, 136.1, 141.0, 168.6, 170.33 (C); CHN: ber. C 55.27, H 3.34, N 7.74, gef. C 55.13, H 3.42, N 7.48; C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (543.24); MS (EI):  $m/z$  (%): 543.0 [M]<sup>+</sup>• (14), 401.9 [M<sup>+</sup>•–141] (100); HPLC (isokratisch): 98.4% bei 254 nm, 98.5% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 5.47 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/H<sub>2</sub>O = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 233 nm, 231 nm, 318 nm; HPLC (Gradient-Methode A): 98.3% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 13.01 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.25 min.

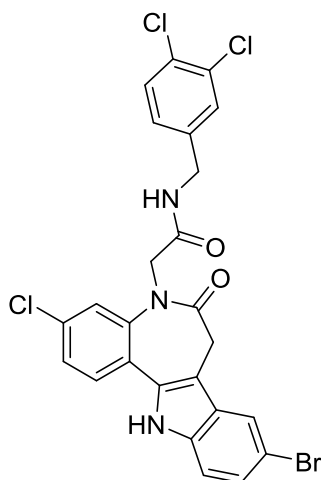
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(3-chlor-benzyl)acetamid (**35c**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 294 mg, 700  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (511  $\mu\text{L}$ , 2.93 mmol), PyBOP (442 mg, 849  $\mu\text{mol}$ ) und 3-Chlorbenzylamin (100  $\mu\text{L}$ , 827  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Nach Umkristallisation aus Methanol wurde ein farbloser Feststoff erhalten (95 mg, 25%).

Zers.: ab 342 °C; IR (KBr): 3307  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1639  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.73 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, -NH), 7.98 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.67 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.49 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.38–7.28 (m, 4H, ArH), 7.26–7.21 (m, 1H, ArH), 4.35 (bs, 4H, - $N^5$ -CH<sub>2</sub> und -CH<sub>2</sub>), 3.99 und 3.13 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.2, 41.6, 53.6 (CH<sub>2</sub>); 113.6, 120.8, 124.0, 124.1, 124.9, 125.2, 126.7, 126.9, 128.6, 130.1 (CH); 109.4, 111.9, 125.7, 127.8, 132.4, 132.98, 133.04, 136.0, 141.1, 141.9, 168.6, 170.3 (C); CHN: ber. C 55.27, H 3.34, N 7.74, gef. C 54.88, H 3.38, N 7.56; C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (543.24); MS (EI):  $m/z$  (%): 542.9 [ $M$ ]<sup>+</sup> (24), 401.9 [ $M$ ]<sup>+</sup>–141 (100); HPLC (isokratisch): 95.9% bei 254 nm, 96.3% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 5.40 min,  $t_M$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/H<sub>2</sub>O = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm, 383 nm; HPLC (Gradient-Methode B): 96.7% bei 254 nm,  $t_{M+S}$  = 13.38 min,  $t_M$  (DMSO) = 1.25 min.

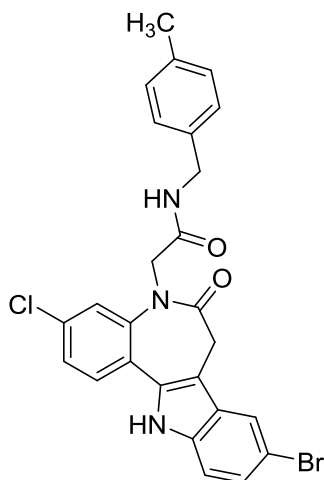
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(3,4-dichlorbenzyl)acetamid (**35d**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 295 mg, 703  $\mu$ mol), DIPEA (511  $\mu$ L, 2.93 mmol), PyBOP (447 mg, 859  $\mu$ mol) und 3,4-Dichlorbenzylamin (111  $\mu$ L, 834  $\mu$ mol) in DMF (1 mL). Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde ein farbloser Feststoff erhalten (81 mg, 20%).

Zers.: ab 325 °C; IR (KBr): 3312  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1638  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1654  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.00 (s, 1H, Indol-NH), 8.76 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, -NH), 7.98 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.66 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.59 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.54 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.50 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.31 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.27 (dd,  $J$  = 8.3, 2.0 Hz, 1H, ArH), 4.34 (bs, 4H, - $N^5$ -CH<sub>2</sub> und -CH<sub>2</sub>), 4.00 und 3.14 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.2, 41.1, 53.7 (CH<sub>2</sub>); 113.7, 120.8, 124.1, 124.9, 125.2, 127.4, 128.6, 129.0, 130.4 (CH); 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 129.3, 131.0, 132.5, 133.0, 136.0, 140.6, 141.0, 168.7, 170.4 (C); CHN: ber. C 51.98, H 2.97, N 7.27, gef. C 52.13, H 2.79, N 7.07; C<sub>25</sub>H<sub>17</sub>BrCl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (577.68); MS (EI):  $m/z$  (%): 576.9 [ $M$ ]<sup>+</sup> (24), 402.0 [ $M$ ]<sup>+</sup>-174.9] (100); HPLC (isokratisch) 99.5% bei 254 nm, 99.6% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 7.49 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/H<sub>2</sub>O = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 228 nm, 319 nm; HPLC (Gradient-Methode A): 99.7% bei 254 nm,  $t_{M+S}$  = 13.64 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.25 min.

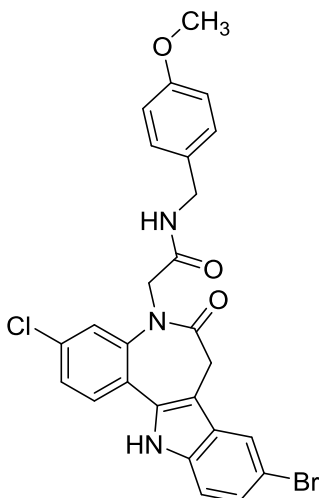
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(4-methylbenzyl)acetamid (**35e**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 296 mg, 705  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (511  $\mu\text{L}$ , 2.93 mmol), PyBOP (440 mg, 846  $\mu\text{mol}$ ) und 4-Methylbenzylamin (100  $\mu\text{L}$ , 786  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Methanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (120 mg, 33%).

Zers.: ab 326 °C; IR (KBr): 3317  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1653  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1640  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.60 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, -NH), 7.97 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.68 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.49 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.13 (q,  $J$  = 8.0 Hz, 4H, ArH), 4.28 (bs, 4H, - $N^5$ -CH<sub>2</sub> und -CH<sub>2</sub>), 3.99 und 3.11 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 2.28 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 20.7 (CH<sub>3</sub>); 31.2, 41.9, 53.5 (CH<sub>2</sub>); 113.6, 120.8, 124.1, 124.9, 125.2, 127.0 (2C), 128.6, 128.8 (2C) (CH); 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 132.5, 133.0, 135.8, 136.0, 136.2, 141.1, 168.2, 170.2 (C); CHN: ber. C 59.73, H 4.05, N 8.04, gef. C 59.70, H 4.03, N 7.81; C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>BrClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (522.83); MS (EI):  $m/z$  (%): 523.0 [M]<sup>+</sup>• (24), 402.0 [M<sup>+</sup>•-121] (100); HPLC (isokratisch): 99.2% bei 254 nm, 99.2% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 5.37 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/H<sub>2</sub>O = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 236 nm, 318 nm, 391 nm; HPLC (Gradient-Methode B): 99.1% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 13.21 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.25 min.

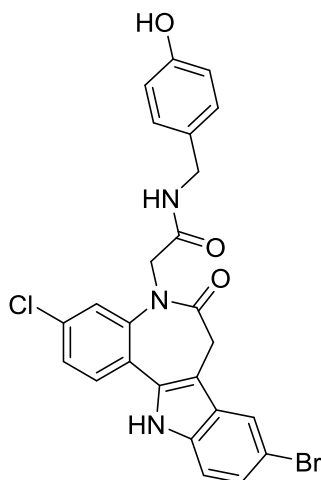
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(4-methoxybenzyl)acetamid (**35f**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 217 mg, 517  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (370  $\mu\text{L}$ , 2.12 mmol), PyBOP (318 mg, 611  $\mu\text{mol}$ ) und 4-Methoxybenzylamin (83.0  $\mu\text{L}$ , 635  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Nach Umkristallisation aus Methanol wurde ein farbloser Feststoff erhalten (82 mg, 29%).

Zers.: ab 313 °C; IR (KBr): 3314  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1654  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1640  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.00 (s, 1H, Indol-NH), 8.59 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 1H, -NH), 7.98 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.69 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.50 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.31 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.23–7.16 (m, 2H, ArH), 6.94–6.85 (m, 2H, ArH), 4.26 (bs, 4H, - $N^{\text{F}}$ -CH<sub>2</sub> und -CH<sub>2</sub>), 4.00 und 3.13 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.75 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 54.8 (CH<sub>3</sub>); 30.9, 41.4, 53.3 (CH<sub>2</sub>); 113.4 (3C), 120.5, 123.9, 124.7, 124.9, 128.2 (2C), 128.4 (CH); 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 131.1, 132.5, 133.0, 136.0, 141.1, 158.2, 168.2, 170.2 (C); CHN: ber. C 57.96, H 3.93, N 7.80, gef. C 57.76, H 3.74, N 7.45; C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>BrClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (538.83); MS (EI):  $m/z$  (%): 539.0 [ $\text{M}]^{+\bullet}$  (24), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-137$ ] (100); HPLC (isokratisch): 99.2% bei 254 nm, 99.4% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.10 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/H<sub>2</sub>O = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 235 nm, 318 nm, 389 nm; HPLC (Gradient-Methode B): 99.6% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 12.45 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.25 min.

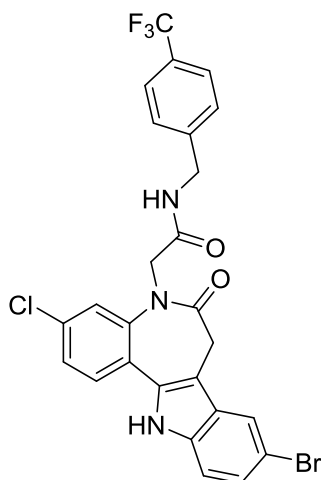
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(4-hydroxybenzyl)acetamid (**35g**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 295 mg, 703  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (1.02 mL, 5.86 mmol), PyBOP (449 mg, 863  $\mu\text{mol}$ ) und 4-Hydroxylbenzylamin Hydrobromid (**47**, 178 mg, 877  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (146 mg, 40%).

Zers.: ab 280 °C; IR (KBr): 3312  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1655  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1638  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.00 (s, 1H, Indol-NH), 9.31 (s, 1H, -OH), 8.54 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 1H, -NH), 7.98 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.68 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.49 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.31 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.10–7.05 (m, 2H, ArH), 6.79–6.65 (m, 2H, ArH), 4.22 (s, 4H, - $\text{N}^{\text{F}}$ - $\text{CH}_2$  und - $\text{CH}_2$ ), 4.01 und 3.13 (s, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.2, 41.7, 53.5 ( $\text{CH}_2$ ); 113.7, 115.0 (2C), 120.8, 124.1, 124.9, 125.2, 128.4 (2C), 128.6 (CH); 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 129.3, 132.5, 133.0, 136.0, 141.1, 156.3, 168.1, 170.2 (C); CHN: ber. C 57.22, H 3.65, N 8.01, gef. C 56.88, H 3.85, N 7.74;  $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{BrClN}_3\text{O}_3$  (524.80); MS (EI):  $m/z$  (%): 525.0 [ $\text{M}]^{+\bullet}$  (21), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-123$ ] (100); HPLC (isokratisch): 98.3% bei 254 nm, 99.0% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.55 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  = 50:50);  $\lambda_{\text{max}}$ : 228 nm, 319 nm, 390 nm; HPLC (Gradient-Methode A): 95.5% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 11.29 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.25 min.

2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(4-trifluoromethylbenzyl)acetamid (**35h**)

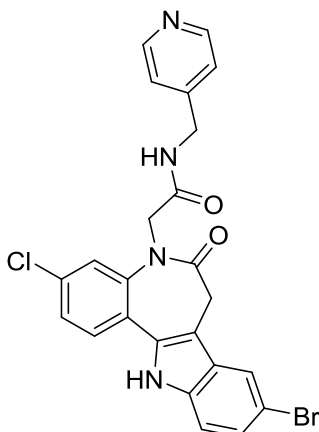


Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 210 mg, 500  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (370  $\mu\text{L}$ , 2.12 mmol), PyBOP (316 mg, 607  $\mu\text{mol}$ ) und 4-Trifluormethylbenzylamin (88.0  $\mu\text{L}$ , 615  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde ein farbloser Feststoff erhalten (43 mg, 15%).

Zers.: ab 321 °C; IR (KBr): 3312  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1659  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1639  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.01 (s, 1H, Indol-NH), 8.79 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, -NH), 7.98 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.71–7.66 (m, 3H, ArH), 7.51–7.49 (m, 3H, ArH), 7.45–7.42 (m, 1H, ArH), 7.31 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 4.43 (bs, 4H, -*N*<sup>5</sup>-CH<sub>2</sub> und -CH<sub>2</sub>), 4.01 und 3.14 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.2, 41.8, 53.6 (CH<sub>2</sub>); 113.4, 120.5, 123.9, 124.7, 124.9 (2C, q,  $J$  = 3.8 Hz), 125.0, 127.5 (2C), 128.4 (CH); 109.4, 111.9, 124.0, 124.4 (q,  $J$  = 271.8 Hz), 127.5 (q,  $J$  = 31.6 Hz), 132.5, 133.0, 136.0, 141.0, 144.3, 168.6, 170.3 (C); CHN: ber. C 54.14, H 3.15, N 7.29, gef. C 53.97, H 3.01, N 6.95;  $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{BrClF}_3\text{N}_3\text{O}_2$  (576.80); MS (EI):  $m/z$  (%): 577.0 [ $\text{M}]^{+\bullet}$  (28), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-175$ ] (100); HPLC (isokratisch): 98.5% bei 254 nm, 98.8% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 6.51 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 235 nm, 318 nm, 392 nm; HPLC (Gradient-Methode B): 98.0% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 13.20 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.25 min.



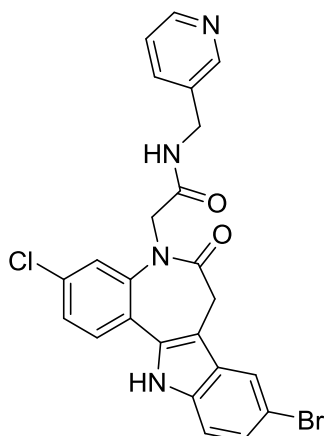
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(pyridin-4-ylmethyl)acetamid (35i)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 211 mg, 503  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (370  $\mu\text{L}$ , 2.12 mmol), PyBOP (280 mg, 538  $\mu\text{mol}$ ) und Pyridin-4-ylmethanamin (61  $\mu\text{L}$ , 0.60 mmol) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Methanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (83 mg, 33%).

Zers.: ab 301 °C; IR (KBr): 3401  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3231  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1687  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1655  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.00 (s, 1H, Indol-NH), 8.78 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, -NH), 8.55–8.45 (m, 2H, ArH), 7.98 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.69 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.50 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.28–7.25 (m, 2H, ArH), 4.36 (bs, 4H, - $N^{\delta}$ -CH<sub>2</sub> und -CH<sub>2</sub>), 4.01 und 3.13 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.2, 41.2, 53.6 (CH<sub>2</sub>); 113.6, 120.8, 121.9 (2C), 124.2, 124.9, 125.2, 128.6, 149.4 (2C) (CH); 148.4, 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 132.5, 133.0, 136.0, 141.0, 168.8, 170.4 (C); CHN: ber. C 56.55, H 3.56, N 10.99, gef. C 56.31, H 3.54, N 10.60; C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>BrClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (509.79); MS (EI):  $m/z$  (%): 510.0 [ $M$ ]<sup>+</sup>• (24), 402.0 [ $M$ ]<sup>+</sup>•–108.0] (100); HPLC (isokratisch): 97.7% bei 254 nm, 98.2% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 4.79 min,  $t_M$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 40:60);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm.

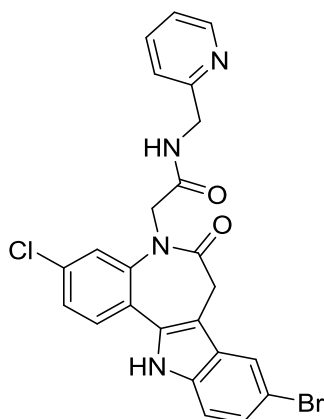
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)acetamid (35j)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 218 mg, 519  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (370  $\mu\text{L}$ , 2.12 mmol), PyBOP (340 mg, 653  $\mu\text{mol}$ ), und Pyridin-3-ylmethanamin (61  $\mu\text{L}$ , 0.60 mmol) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Methanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (38 mg, 14%).

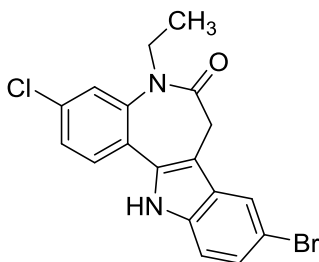
Zers.: ab 308 °C; IR (KBr): 3348  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1698  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1645  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.00 (s, 1H, Indol-NH), 8.79 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, -NH), 8.54–8.52 (m, 1H, ArH), 7.98 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.78 (dd,  $J$  = 7.7, 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.76–7.72 (m, 2H, ArH), 7.51 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.36–7.23 (m, 3H, ArH), 4.34 (bs, 4H,  $-N^{\text{F}}\text{-CH}_2$  und  $-\text{CH}_2$ ), 4.01 und 3.15 (bs, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.0, 43.9, 53.5 ( $\text{CH}_2$ ); 113.4, 120.5, 120.6, 121.8, 123.9, 124.7, 125.0, 128.4, 136.4, 148.6 (CH); 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 132.5, 133.0, 136.0, 141.1, 158.4, 168.6, 170.3 (C); CHN: ber. C 56.55, H 3.56, N 10.99, gef. C 56.60, H 3.80, N 10.65;  $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{BrClN}_4\text{O}_2$  (509.79); MS (EI):  $m/z$  (%): 510.0  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (49), 402.0  $[\text{M}^{+\bullet}-108.0]$  (100); HPLC (isokratisch): 99.6% bei 254 nm, 99.6% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 3.40 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 40:60);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm.

2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(pyridin-2-ylmethyl)acetamid (35k)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 218 mg, 519  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (370  $\mu\text{L}$ , 2.12 mmol), PyBOP (284 mg, 546  $\mu\text{mol}$ ), und Pyridin-2-ylmethanamin (61  $\mu\text{L}$ , 0.62 mmol) in DMF (1 mL). Nach Umkristallisation aus Methanol wurde ein farbloser Feststoff erhalten (26 mg, 10%).

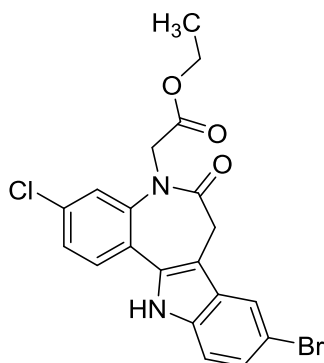
Zers.: ab 313 °C; IR (KBr): 3300  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1643  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.01 (s, 1H, Indol-NH), 8.79 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, -NH), 8.60–8.39 (m, 2H, ArH), 7.99 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.74 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.70 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.51 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.31 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.29–7.26 (m, 2H, ArH), 4.37 (bs, 4H, - $\text{N}^{\text{F}}$ -CH<sub>2</sub> und -CH<sub>2</sub>), 4.02 und 3.14 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 30.9, 40.9, 53.4 (CH<sub>2</sub>); 113.4, 120.5, 121.7 (2C), 123.91, 124.7, 125.0, 128.4, 149.2 (2C) (CH); 109.4, 111.9, 124.1, 127.8, 132.5, 133.0, 136.0, 141.0, 148.4, 168.8, 170.4 (C); C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>BrClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (509.79); MS (EI):  $m/z$  (%): 510.0 [ $\text{M}]^{+\bullet}$  (13), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-108.0$ ] (100); HRMS (EI):  $m/z$  [ $\text{M}]^{+\bullet}$  ber. 508.02962, gef. 508.03027; HPLC (isokratisch): 99.5% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 3.75 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 50:50);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm, 389 nm.

9-Brom-3-chlor-5-ethyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (36a)

Es wurde nach der AAV2 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**32**, 123 mg, 340  $\mu\text{mol}$ ), Iodethan (40.0  $\mu\text{L}$ , 498  $\mu\text{mol}$ ) und Kalium-*tert*-butylat (45.0 mg, 401  $\mu\text{mol}$ ) in getrocknetem Tetrahydrofuran (10 mL). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 1:1) wurden farblose Kristalle erhalten (16 mg, 12%).

Schmp.: ab 294 °C; IR (KBr): 3435  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3277  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1639  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.98 (s, 1H, Indol-NH), 7.95 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.75 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.49 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.41 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 3.95 (bs, 2H, -*N*<sup>5</sup>-CH<sub>2</sub>), 3.70 und 2.99 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 0.86 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.8 (CH<sub>3</sub>); 31.3, 44.2 (CH<sub>2</sub>); 113.4, 120.5, 124.2, 124.7, 125.1, 128.5 (CH); 110.0, 111.9, 125.0, 127.7, 132.6, 132.8, 136.0, 140.0, 169.2 (C); CHN: ber. C 55.48, H 3.62, N 7.19, gef. C 55.74, H 3.24, N 6.97; C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>BrClN<sub>2</sub>O (389.68); MS (EI):  $m/z$  (%): 390.0 [M]<sup>+</sup>• (68), 360.9 [M<sup>+</sup>•-29.1] (100); HPLC (isokratisch) 97.7% bei 254 nm, 97.6% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 5.53 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 233 nm, 319 nm, 395 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 98.5% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 13.29 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.25 min.

Ethyl-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetat  
(**36b**)

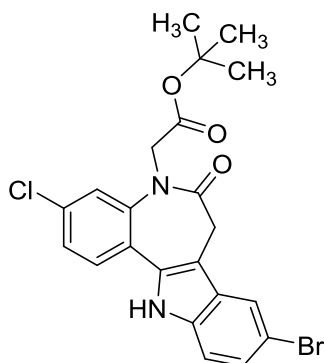


Es wurde nach der AAV2 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**32**, 300 mg, 830  $\mu\text{mol}$ ), 2-Bromessigsäureethylester (162 mg, 970  $\mu\text{mol}$ ) und Kalium-*tert*-butylat (112 mg, 998  $\mu\text{mol}$ ) in getrocknetem Tetrahydrofuran (20 mL). Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde ein farbloses Pulver erhalten (87 mg, 24%).

Schmp.: 291–292 °C (Lit.<sup>164</sup>: 289–294 °C); IR (KBr): 3316  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1741  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1649  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.01 (s, 1H, Indol-NH), 7.96 (dd,  $J$  = 1.9, 0.6 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, ArH, 1H, ArH), 7.61 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.50 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (dd,  $J$  = 8.7, 0.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 4.49 (bs, 2H,  $-\text{N}^5\text{-CH}_2$ ), 4.04 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, O- $\text{CH}_2$ ), 4.01 und 3.12 (bs, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 1.08 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $-\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.3 ( $\text{CH}_3$ ); 31.4, 52.7, 61.1 ( $\text{CH}_2$ ); 114.1, 121.2, 124.5, 125.4, 126.0, 129.2 (CH); 109.1, 111.9, 124.3, 127.8, 132.6, 133.0, 136.0, 140.4, 169.2, 170.3 (C); CHN: ber. C 53.65, H 3.60, N 6.26, gef. C 53.81, H 3.69, N 5.96;  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{BrClN}_2\text{O}_3$  (447.71).

Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>164</sup>

*tert*-Butyl-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetat (**36c**)

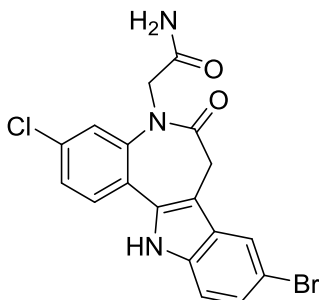


Es wurde nach der AAV2 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**32**, 615 mg, 1.70 mmol), 2-Bromessigsäure-*tert*-butylester (300  $\mu$ L, 2.03 mmol) und Kalium-*tert*-butylat (224 mg, 2.00  $\mu$ mol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (20 mL). Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde ein gelbes Pulver erhalten (500 mg, 62%).

Zers.: 274–275 °C (Lit.<sup>165</sup>: 278–281 °C, Schmp.); IR (KBr): 3335  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1736  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1654  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.01 (s, 1H, Indol-NH), 7.96 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.74 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.59 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.50 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 4.42 (s, 2H,  $-N^5\text{-CH}_2$ ), 3.99 und 3.10 (bs, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 1.25 (s, 9H,  $-\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 27.4 (3C) ( $\text{CH}_3$ ); 30.9, 52.7 ( $\text{CH}_2$ ); 113.6, 120.7, 123.9, 124.9, 125.3, 128.7 (CH); 80.9, 109.2, 111.8, 124.3, 127.8, 132.5, 133.0, 136.0, 140.3, 168.1, 170.2 (C);  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{BrClN}_2\text{O}_3$  (475.77).

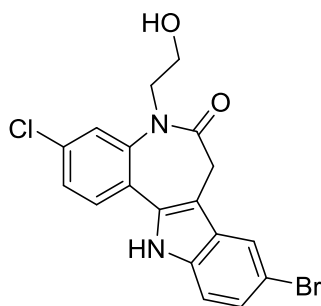
Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>165</sup>

2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetamid  
(**36d**)



Es wurde nach der AAV2 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**32**, 371 mg, 1.03 mmol), Kalium-*tert*-butylat (126 mg, 1.12 mmol) und 2-Bromacetamid (248 mg, 1.80 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (25 mL). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat/Petrolether 1:1). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (15 mg, 3%).

Zers.: ab 297 °C; IR (KBr): 3466 cm<sup>-1</sup> (NH), 3306 cm<sup>-1</sup> (NH), 1678 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1666 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1638 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 7.96 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.61 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.58 (s, 1H, -NH), 7.48 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.18 (s, 1H, -NH), 4.36 (bs, 1H, -N<sup>5</sup>-CH<sub>2</sub>), 4.01 (bs, 2H, -N<sup>6</sup>-CH<sub>2</sub> und Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.11 (bs, 1H, Azepin-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 30.9, 53.2 (CH<sub>2</sub>); 113.4, 120.5, 123.6, 124.7, 124.8, 128.3 (CH); 109.4, 111.9, 123.9, 127.8, 132.4, 133.0, 136.0, 141.2, 170.2, 170.3 (C); C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>BrClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (418.68); MS (EI): *m/z* (%): 419.0 [M]<sup>+</sup>• (56), 402.0 [M]<sup>+</sup>•-17 (100), 361 [M]<sup>+</sup>•-58 (32); HRMS (ESI): *m/z* (C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>BrClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na, Monokation) ber. 441.97494, gef. 441.97507; HPLC (isokratisch) 97.7% bei 254 nm, 97.8% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 5.29 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 40:60); λ<sub>max</sub>: 231 nm, 319 nm, 384 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 97.3% bei 254 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 10.52 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.25 min.

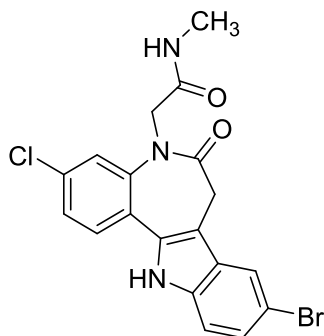
9-Brom-3-chlor-5-(2-hydroxyethyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (36e)

Zu einer Suspension aus  $\text{LiAlH}_4$  (16.0 mg, 422  $\mu\text{mol}$ ) in getrocknetem Tetrahydrofuran (10 mL) wurde unter Rühren eine Lösung aus Ethyl-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetat (**36b**, 160 mg, 357  $\mu\text{mol}$ ) in getrocknetem Tetrahydrofuran (30 mL) hinzu getropft. Die erhaltene Suspension wurde für 10 h unter Verwendung eines Metallkühlers refluxiert. Stündlich wurde dabei  $\text{LiAlH}_4$  (20.0 mg, 527  $\mu\text{mol}$ ) hinzugegeben. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde tropfenweise Wasser hinzugegeben, bis sich die Wasserstoffentstehung eingestellt hatte. Das Präzipitat wurde unter tropfenweiser Zugabe von 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst. Die resultierende Lösung wurde mit Ethylacetat extrahiert (3x50 mL), die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Ethylacetat 10:1). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (12 mg, 7%).

Zers.: 255–256 °C; IR (KBr): 3280  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1638  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.96 (s, 1H, Indol-NH), 8.09 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.95 (dd,  $J$  = 1.9, 0.6 Hz, 1H, ArH), 7.70 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.47 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.41 (dd,  $J$  = 8.6, 0.5 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 4.91 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 1H, -OH), 3.95 (bs, 1H), 3.77 (bs, 2H), 3.60 (bs, 1H), 3.40 (bs, 1H), 3.01 (bs, 1H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.6, 53.6, 58.2 ( $\text{CH}_2$ ); 113.6, 120.8, 124.9, 125.1, 125.5, 128.6 (CH); 109.8, 111.8, 124.3, 127.7, 132.4, 133.0, 136.1, 141.2, 169.3 (C);  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrClN}_2\text{O}_2$  (405.68); CHN: ber. C 53.29, H 3.48, N 6.91, gef. C 53.36, H 3.42, N 6.74; MS (EI):  $m/z$  (%): 406.0 [ $\text{M}]^{+\bullet}$  (82), 362.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-44$ ] (100); HPLC (isokratisch) 97.6% bei 254 nm, 96.9% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.61 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 50:50);  $\lambda_{\text{max}}$ : 233 nm, 319 nm, 381 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 97.7% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 11.38 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.25 min.



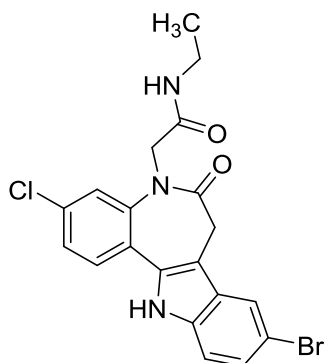
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-methylacetamid (36g)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 294 mg, 701  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (511  $\mu\text{L}$ , 2.93 mmol), PyBOP (441 mg, 847  $\mu\text{mol}$ ) und Methylamin in THF ( $c = 2 \text{ M}$ , 415  $\mu\text{L}$ , 830  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (132 mg, 37%).

Zers.: 351–355 °C; IR (KBr): 3312  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1658  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1639  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.07 (q,  $J = 4.6 \text{ Hz}$ , 1H, -NH), 7.96 (d,  $J = 1.9 \text{ Hz}$ , 1H, ArH), 7.72 (d,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , 1H, ArH), 7.68 (d,  $J = 2.1 \text{ Hz}$ , 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J = 8.4, 2.1 \text{ Hz}$ , 1H, ArH), 7.42 (d,  $J = 8.6 \text{ Hz}$ , 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J = 8.6, 1.9 \text{ Hz}$ , 1H, ArH), 4.36 und 4.07 (bs, 2H, - $N^5$ -CH $_2$ ), 3.99 und 3.10 (bs, 2H, Azepin-CH $_2$ ), 2.64 (d,  $J = 4.6 \text{ Hz}$ , 3H, -CH $_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 25.6 (CH $_3$ ); 31.2, 53.7 (CH $_2$ ); 113.6, 120.7, 124.1, 124.9, 125.1, 128.6 (CH); 109.4, 111.9, 123.9, 127.8, 132.4, 133.0, 136.0, 141.2, 168.7, 170.1 (C); CHN: ber. C 52.74, H 3.49, N 9.71, gef. C 52.48, H 3.40, N 9.43;  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{BrClN}_3\text{O}_2$  (432.70); MS (EI):  $m/z$  (%): 433.0 [ $\text{M}]^{+\bullet}$  (31), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-31$ ] (100), 361.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-72$ ] (11); HPLC (isokratisch) 99.2% bei 254 nm, 99.3% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}} = 3.77 \text{ min}$ ,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO}) = 1.06 \text{ min}$  (ACN/Wasser = 50:50);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm, 395 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 98.8% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}} = 10.93 \text{ min}$ ,  $t_{\text{M}}(\text{DMSO}) = 1.25 \text{ min}$ .

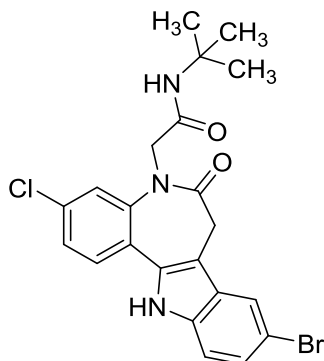
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-ethylacetamid (36h)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 297 mg, 708  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (511  $\mu\text{L}$ , 2.93 mmol), PyBOP (445 mg, 855  $\mu\text{mol}$ ) und Ethylamin in THF ( $c = 2 \text{ M}$ , 415  $\mu\text{L}$ , 830  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (200 mg, 70%).

Zers.: 327–328 °C; IR (KBr): 3324  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1641  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.09 (t,  $J = 5.5 \text{ Hz}$ , 1H, -NH), 7.96 (d,  $J = 1.9 \text{ Hz}$ , 1H, ArH), 7.72 (d,  $J = 8.5 \text{ Hz}$ , 1H, ArH), 7.67 (d,  $J = 2.1 \text{ Hz}$ , 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J = 8.4, 2.1 \text{ Hz}$ , 1H, ArH), 7.42 (d,  $J = 8.7 \text{ Hz}$ , 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J = 8.6, 1.9 \text{ Hz}$ , 1H, ArH), 4.34 und 4.10 (bs, 2H, - $N^5$ -CH $_2$ ), 4.01 und 3.12 (bs, 2H, Azepin-CH $_2$ ), 3.12 (qd,  $J = 7.2, 5.4 \text{ Hz}$ , 2H, -CH $_2$ ), 1.03 (t,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , 3H, -CH $_3$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 15.1 (CH $_3$ ); 31.7, 34.0, 54.0 (CH $_2$ ); 114.1, 121.2, 124.6, 125.4, 125.6, 129.1 (CH); 109.4, 111.8, 124.0, 127.8, 132.4, 133.0, 136.0, 141.1, 167.8, 170.1 (C); CHN: ber. C 53.77, H 3.84, N 9.41, gef. C 53.84, H 3.76, N 9.26; C $_{20}$ H $_{17}$ BrClN $_3$ O $_2$  (446.73); MS (EI):  $m/z$  (%): 447.0 [ $M$ ] $^{+\bullet}$  (24), 402.0 [ $M$ ] $^{+\bullet}-45$ ] (100), 361 [ $M$ ] $^{+\bullet}-86$ ] (11); HPLC (isokratisch) 97.7% bei 254 nm, 98.0% bei 280 nm,  $t_{M+S} = 4.67 \text{ min}$ ,  $t_M$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 50:50);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm, 389 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 95.4% bei 254 nm,  $t_{M+S} = 11.45 \text{ min}$ ,  $t_M$  (DMSO) = 1.25 min.

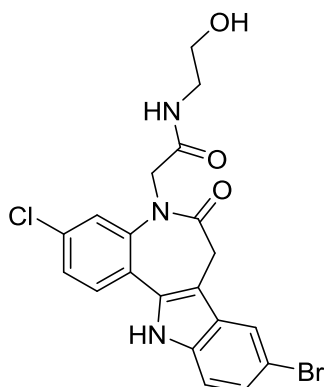
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(*tert*-butyl)acetamid (36i)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 305 mg, 727  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (511  $\mu\text{L}$ , 2.93 mmol), PyBOP (450 mg, 865  $\mu\text{mol}$ ) und 2-Methylpropan-2-amin (87  $\mu\text{L}$ , 0.83 mmol) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert und es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (118 mg, 34%).

Zers.: 291–293 °C; IR (KBr): 3336  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3284  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1681  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1647  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.00 (s, 1H, Indol-NH), 7.95 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.71 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.61 (bs, 2H, ArH und -NH), 7.47 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 4.36 und 4.07 (bs, 2H, - $N^5$ -CH $_2$ ), 4.00 und 3.06 (bs, 2H, Azepin-CH $_2$ ), 1.23 (s, 9H, -CH $_3$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 28.5 (CH $_3$ ); 31.2, 53.3 (CH $_2$ ); 113.6, 120.7, 123.9, 124.9, 125.0, 128.6 (CH); 50.3, 109.5, 111.9, 124.0, 127.8, 132.4, 133.0, 136.0, 141.0, 167.2, 170.1 (C); CHN: ber. C 55.66, H 4.46, N 8.85, gef. C 55.32, H 4.43, N 8.61; C $_{22}$ H $_{21}$ BrClN $_3$ O $_2$  (474.78); MS (EI):  $m/z$  (%): 475.1 [ $\text{M}^{+\bullet}$ ] (31), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-72.1$ ] (100), 361.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-114.1$ ] (20); HPLC (isokratisch) 98.1% bei 254 nm, 97.8% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.46 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 233 nm, 219 nm, 384 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 98.0% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 12.68 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.25 min.

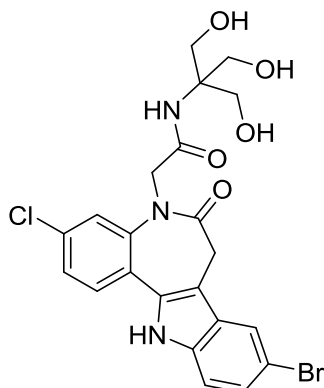
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(2-hydroxyethyl)acetamid (**36j**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 212 mg, 505  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (370  $\mu\text{L}$ , 2.12 mmol), PyBOP (310 mg, 596  $\mu\text{mol}$ ) und 2-Aminoethan-1-ol (36.0  $\mu\text{L}$ , 595  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (20 mg, 19%).

Zers.: 285–290 °C; IR (KBr): 3323  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1660  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1641  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.12 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, NH), 7.96 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.67 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.49 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.31 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 4.70 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 1H, -OH), 4.41 und 4.10 (bs, 2H, - $N^6$ -CH $_2$ ), 3.98 und 3.11 (bs, 2H, Azepin-CH $_2$ ), 3.42 (q,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, O-CH $_2$ ), 3.18 (bq, 2H, N-CH $_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 30.0, 41.3, 53.2, 59.5 (CH $_2$ ); 113.4, 120.5, 123.8, 124.7, 124.9, 128.3 (CH), 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 132.4, 133.0, 136.0, 141.2, 168.3, 170.1 (C); CHN: ber. C 51.91, H 3.70, N 9.08, gef. C 51.67, H 3.59, N 8.98;  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{BrClN}_3\text{O}_3$  (462.73); MS (EI):  $m/z$  (%): 463.0 [ $\text{M}]^{+\bullet}$  (6), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-61$ ] (29), 361.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-102$ ] (100); HPLC (isokratisch): 99.5% bei 254 nm, 99.6% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 5.14 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 40:60);  $\lambda_{\text{max}}$ : 231 nm, 319 nm, 382 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 98.5% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 10.12 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.25 min.

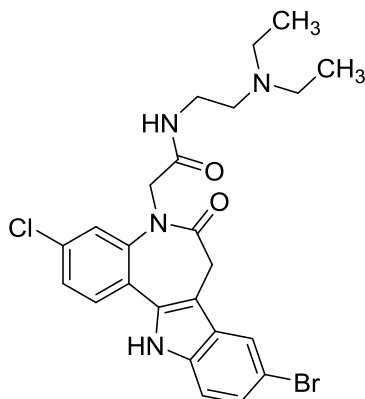
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-[1,3-di-hydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]acetamid (**36k**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 301 mg, 717  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (511  $\mu\text{L}$ , 2.93 mmol), PyBOP (444 mg, 853  $\mu\text{mol}$ ) und 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (101 mg, 834  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Ethanol/Ethylacetat 1:1 umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (28 mg, 7%).

Zers.: 261–262 °C; IR (KBr): 3270  $\text{cm}^{-1}$  (OH), 1655  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1633  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 7.95 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.66 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.35 (s, 1H, -NH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 4.59 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 3H, -OH), 4.49 und 4.16 (bs, 2H, - $N^5$ -CH<sub>2</sub>), 3.56 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 6H, -CH<sub>2</sub>), 4.02 und 3.07 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.2, 53.6, 60.3 (3C) (CH<sub>2</sub>); 113.7, 120.7, 124.0, 125.0, 125.1, 128.6 (CH); 62.4, 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 132.5, 133.0, 136.0, 140.9, 168.9, 170.2 (C); C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>BrClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (522.78); MS (EI):  $m/z$  (%): 523.0 [ $M$ ]<sup>+</sup>• (9), 402.0 [ $M$ ]<sup>+</sup>•–121 (37), 361.0 [ $M$ ]<sup>+</sup>•–162 (100); HRMS (EI):  $m/z$  [ $M$ ]<sup>+</sup>• ber. 521.03476, gef. 521.03512; HPLC (isokratisch) 99.5% bei 254 nm, 99.8% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 4.27 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 40:60);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 96.7% bei 254 nm,  $t_{M+S}$  = 9.71 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.25 min.

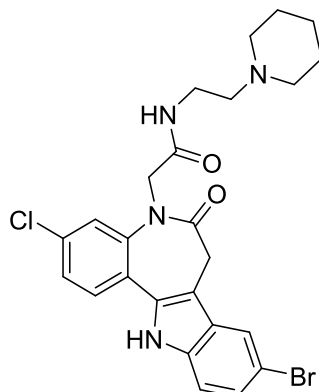
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]acetamid (36I)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 210 mg, 500  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (500  $\mu\text{L}$ , 2.87 mmol), PyBOP (312 mg, 600  $\mu\text{mol}$ ) und *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-Diethylethan-1,2-diamin (58.0  $\mu\text{L}$ , 605  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (84 mg, 32%).

Zers.: ab 267 °C; IR (KBr): 3317  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1639  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 7.98 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, -NH), 7.96 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.65 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 4.38 (bs, 1H, -*N*<sup>5</sup>-CH<sub>2</sub>), 4.05 (bs, 2H, -*N*<sup>5</sup>-CH<sub>2</sub> und Azepin-CH<sub>2</sub> überlagert), 3.14 (q und bs,  $J$  = 6.2 Hz, 3H, Azepin-CH<sub>2</sub> und -CH<sub>2</sub>), 2.47 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H, -CH<sub>2</sub>), 2.43 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 0.94 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H, -CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 11.6 (2C) (CH<sub>3</sub>); 30.9, 36.9, 46.4 (2C), 51.2, 53.3 (CH<sub>2</sub>); 113.4, 120.5, 123.7, 124.7, 124.9, 128.4 (CH); 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 132.4, 133.0, 136.0, 141.1, 168.0, 170.1 (C); CHN: ber. C 55.67, H 5.06, N 10.82, gef. C 55.40, H 4.81, N 10.61; C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>BrClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (516.86); MS (EI):  $m/z$  (%): 518.0 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>• (14), 402.0 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>•-116] (29), 361.0 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>•-157] (24), 99.1 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>•-419] (100); HPLC (isokratisch): 98.8% bei 254 nm, 99.7% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.34 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 40:60);  $\lambda_{\text{max}}$ : 231 nm, 319 nm, 390 nm.

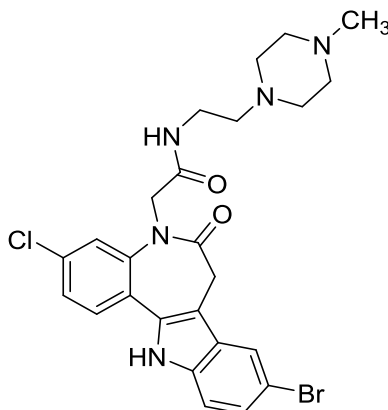
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]acetamid (**36m**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 108 mg, 257  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (511  $\mu\text{L}$ , 2.93 mmol), PyBOP (168 mg, 323  $\mu\text{mol}$ ) und 2-(Piperidin-1-yl)ethan-1-amin (**50a**, 300 mg, 2.34 mmol) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Ethylacetat/Triethylamin/Petrolether 10:1:1) und anschließend durch Umkristallisation aus Ethanol/Petrolether 1:1 aufgereinigt. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (8 mg, 6%).

Zers.: ab 272 °C; IR (KBr): 3300  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1654  $\text{cm}^{-1}$  (C=O); 1638  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.00 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, -NH), 7.96 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.64 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 4.37 und 4.07 (bs, 2H, - $N^5$ -CH $_2$ ), 3.99 und 3.11 (bs, 2H, Azepin-CH $_2$ ), 3.19 (q,  $J$  = 6.5 Hz, 2H, -CH $_2$ ), 2.33 (bs, 4H, -CH $_2$ ), 2.31 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, -CH $_2$ ), 1.48 (p,  $J$  = 5.7 Hz, 4H, -CH $_2$ ), 1.42–1.31 (m, 2H, -CH $_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 24.1, 25.5 (2C), 31.2, 36.4, 53.5, 54.1 (2C), 57.7 (CH $_2$ ); 113.7, 120.8, 124.0, 125.0, 125.2, 128.6 (CH); 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 132.4, 133.0, 136.0, 141.1, 168.1, 170.1 (C);  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{BrClN}_4\text{O}_2$  (526.08); MS (EI):  $m/z$  (%): 530.0 [ $\text{M}^{+\bullet}$ ] (4), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-128$ ] (3), 361.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-169$ ] (7), 98.1 [ $\text{M}^{+\bullet}-431.9$ ] (100); HRMS (EI):  $m/z$  [ $\text{M}^{+\bullet}$ ] ber. 528.09222, gef. 528.09032; HPLC (isokratisch): 98.8% bei 254 nm, 99.8% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 7.46 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 40:60);  $\lambda_{\text{max}}$ : 231 nm, 319 nm, 391 nm.

2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl]acetamid (**36n**)

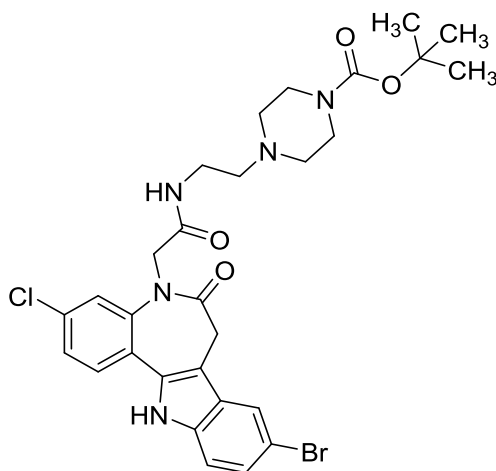


Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 210 mg, 500  $\mu$ mol), DIPEA (450  $\mu$ L, 2.58 mmol), PyBOP (370 mg, 711  $\mu$ mol) und 2-(4-Methylpiperazin-1-yl)ethan-1-amin (86.0 mg, 600  $\mu$ mol) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (110 mg, 40%).

Zers.: ab 266 °C; IR (KBr): 3311  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1654  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1639  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.01 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, -NH), 7.96 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.65 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 4.36 und 4.08 (bs, 2H, - $\text{N}^5\text{-CH}_2$ ), 3.98 und 3.10 (bs, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 3.20 (q,  $J$  = 6.5 Hz, 2H, - $\text{CH}_2$ ), 2.33 (t und bs,  $J$  = 6.8 Hz, 10H, - $\text{CH}_2$ ), 2.14 (s, 3H, - $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 45.5 ( $\text{CH}_3$ ); 30.9, 36.1 (2C), 52.4, 53.3, 54.4, 56.7 (2C) ( $\text{CH}_2$ ); 113.4, 120.5, 123.8, 124.7, 124.9, 128.4 (CH); 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 132.4, 133.0, 136.0, 141.1, 168.1, 170.1 (C);  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{BrClN}_5\text{O}_2$  (544.88); CHN: ber. C 55.11, H 4.99, N 12.85, gef. C 54.82, H 4.75, N 12.53; MS (EI):  $m/z$  (%): 545.0 [ $\text{M}]^{+\bullet}$  (70), 361 [ $\text{M}^{+\bullet}-184$ ] (74), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-143$ ] (47), 126.1 [ $\text{M}^{+\bullet}-419$ ] (100); HPLC (isokratisch): 97.0% bei 254 nm, 98.4% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 5.77 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 40:60);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm, 382 nm.



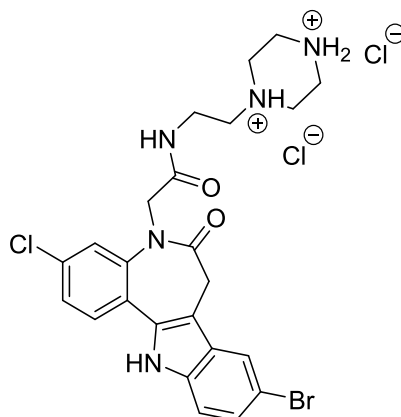
*tert*-Butyl-4-{2-[2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetamido]ethyl}piperazin-1-carboxylat (**36o**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 171 mg, 407  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (400  $\mu\text{L}$ , 2.30 mmol), PyBOP (254 mg, 488  $\mu\text{mol}$ ) und *tert*-Butyl-4-(2-aminoethyl)piperazin-1-carboxylat (112 mg, 488  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde ein farbloser Feststoff erhalten (130 mg, 51%).

Zers.: ab 256  $^{\circ}\text{C}$ ; IR (KBr): 3311  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1696  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1641  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.03 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, -NH), 7.96 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.65 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 4.37 und 4.09 (bs, 2H, - $N^5$ -CH $_2$ ), 3.98 und 3.10 (bs, 2H, Azepin-CH $_2$ ), 3.32–3.26 (m, 4H, -CH $_2$ ), 3.22 (q,  $J$  = 6.4 Hz, 2H, -CH $_2$ ), 2.36 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H, -CH $_2$ ), 2.35–2.32 (m, 4H, -CH $_2$ ), 1.40 (s, 9H, -CH $_3$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 28.1 (3C) (CH $_3$ ); 31.2, 36.2 (2C), 52.4 (2C), 53.5, 56.9 (2C) (CH $_2$ ); 113.6, 120.8, 124.0, 124.9, 125.1, 128.6 (CH); 78.7, 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 132.4, 133.0, 136.0, 141.1, 153.8, 168.1, 170.1 (C);  $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{BrClN}_5\text{O}_4$  (630.97); CHN: ber. C 55.20, H 5.27, N 11.10, gef. C 55.19, H 5.19, N 10.89; MS (EI):  $m/z$  (%): 631.1 [ $\text{M}^+$ ] (7), 402.0 [ $\text{M}^+$ –229.1] (28), 361.0 [ $\text{M}^+$ –270.1] (71), 143.1 [ $\text{M}^+$ –488] (100); HPLC (isokratisch): 95.7% bei 254 nm, 95.2% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.31 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm, 395 nm.

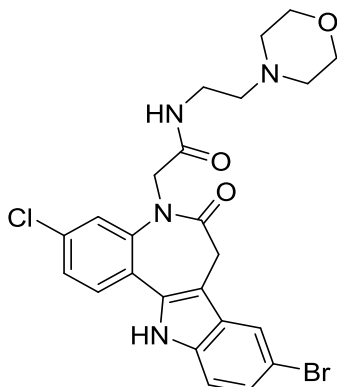
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-[2-(piperazin-1-yl)ethyl]acetamid Dihydrochlorid (**36p**)



Es wurde nach der AAV4 gearbeitet. Die Verbindung wurde aus *tert*-Butyl-4-{2-[2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetamido]ethyl}piperazin-1-carboxylat (**36o**, 102 mg, 162  $\mu$ mol), getrocknetem Dichlormethan (14 mL), Trifluoressigsäure (2.6 mL), Propan-2-ol (3 mL), 10 Tropfen propan-2-olischer HCl und Diethylether (30 mL) synthetisiert. Es wurde ein beiger Feststoff erhalten (43 mg, 47%).

Zers.: ab 239 °C; IR (KBr): 3423  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1661  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1638  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.07 (s, 1H, Indol-NH), 11.63 (bs, 1H, -NH), 9.47 (bs, 2H, - $\text{NH}_2^+$ ), 8.45 (bs, 1H, - $\text{NH}^+$ ), 7.94 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.70 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.49 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 4.33 (bs, 2H, - $\text{N}^{\text{F}}\text{-CH}_2$ ), 3.37 (bs, 14H, Azepin- $\text{CH}_2$  und - $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.2, 33.8 (bs), 48.2 (bs, 2C), 54.0, 55.0 (bs) ( $\text{CH}_2$ , 2 Signale nicht sichtbar); 113.7, 120.7, 124.3, 124.9, 125.2, 128.6 (CH); 109.3, 111.9, 127.8, 129.9, 132.5, 133.0, 136.0, 141.1, 169.1, 170.3 (C); MS (EI):  $m/z$  (%): 531.1 [ $\text{M}^{+\bullet}-72$ ] (3), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-201$ ] (2), 361.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-242$ ] (6), 99.1 [ $\text{M}^{+\bullet}-432$ ] (100);  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{BrCl}_3\text{N}_5\text{O}_2$  (603.77); HRMS (ESI):  $m/z$  ( $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{BrClIN}_5\text{O}_2$ , Monokation) ber. 532.09419, gef. 532.09293; HPLC (isokratisch): 98.9% bei 254 nm, 99.3% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 3.72 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 30:70);  $\lambda_{\text{max}}$ : 231 nm, 319 nm, 393 nm.

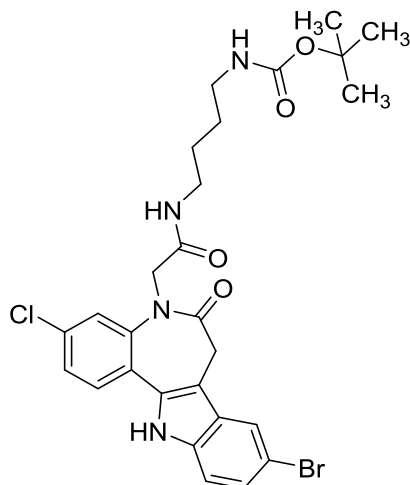
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(2-morpholinoethyl)acetamid (**36q**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 110 mg, 262  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (400  $\mu\text{L}$ , 2.30 mmol), PyBOP (170 mg, 327  $\mu\text{mol}$ ) und 2-Morpholinoethan-1-amin (**50b**, 480 mg, 3.69 mmol) in DMF (2 mL). Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (66 mg, 23%).

Zers.: ab 260 °C; IR (KBr): 3298  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1660  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1639  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.04 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H, -NH), 7.96 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, ArH), 7.65 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J = 8.6, 1.9$  Hz, 1H, ArH), 4.38 und 4.11 (bs, 2H, - $N^{\delta}$ -CH $_2$ ), 3.98 und 3.10 (bs, 2H, Azepin-CH $_2$ ), 3.57 (t,  $J = 4.6$  Hz, 4H, -CH $_2$ ), 3.22 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H, -CH $_2$ ), 2.37 (bs, 4H, -CH $_2$ ), 2.35 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H, -CH $_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.2, 36.0, 53.3 (2C), 53.5, 57.4, 66.2 (2C) (CH $_2$ ); 113.4, 120.5, 123.8, 124.6, 124.9, 128.4 (CH); 109.4, 111.9, 113.6, 127.8, 132.4, 133.0, 136.0, 141.1, 168.1, 170.1 (C);  $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{BrClN}_4\text{O}_3$  (531.84); CHN: ber. C 54.20, H 4.55, N 10.53, gef. C 53.96, H 4.35, N 10.33; MS (EI):  $m/z$  (%): 532.0 [ $\text{M}^{+\bullet}$ ] (24), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-130$ ] (23), 361.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-171$ ] (14), 113.1 [ $\text{M}^{+\bullet}-419$ ] (100); HPLC (isokratisch): 98.0% bei 254 nm, 99.4% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 7.41 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 40:60);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm, 391 nm.

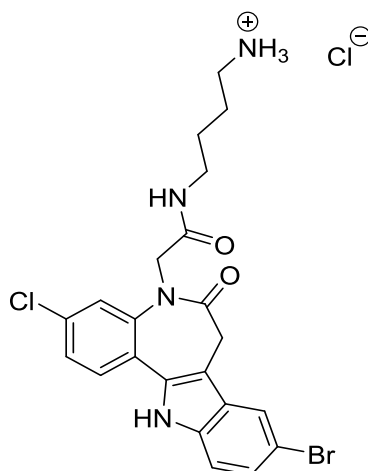
*tert*-Butyl-{4-[2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetamido]butyl}carbamate (**36r**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 110 mg, 262  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (250  $\mu\text{L}$ , 1.44 mmol), PyBOP (187 mg, 359  $\mu\text{mol}$ ) und *tert*-Butyl-(4-aminobutyl)carbamate (68.0 mg, 361  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (20 mg, 13%).

Zers.: 270–271 °C; IR (KBr): 3344  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1679  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1657  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1642  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.98 (s, 1H, Indol-NH), 8.08 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, -NH), 7.95 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.71 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.66 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 6.79 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H; -NH), 4.35 und 4.10 (bs, 2H, - $N^5$ -CH $_2$ ), 3.97 und 3.07 (bs und bq,  $J$  = 4.8 Hz, 4H, Azepin-CH $_2$  und -CH $_2$  überlagert), 2.91 (bq,  $J$  = 6.2 Hz, 2H, -CH $_2$ ), 1.37 (bs, 13H, -CH $_3$  und -CH $_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 28.0 (3C) (CH $_3$ ); 26.2, 26.6, 30.9, 38.2, 39.3, 53.2 (CH $_2$ ); 113.4, 120.5, 123.8, 124.7, 124.8, 128.3 (CH); 77.3, 109.4, 111.8, 123.9, 127.8, 132.4, 133.0, 136.0, 141.1, 155.6, 168.0, 170.1 (C); CHN: ber. C 54.97, H 5.13, N 9.50, gef. C 55.00, H 4.93, N 9.22; C $_{27}$ H $_{30}$ BrClN $_4$ O $_4$  (589.92); MS (EI):  $m/z$  (%): 590.0 [ $M$ ] $^{+\bullet}$  (4), 401.9 [ $M$ ] $^{+\bullet}$ -188.1] (100); HPLC (isokratisch) 95.5% bei 254 nm, 95.8% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 4.35 min,  $t_M$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm, 395 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 95.8% bei 254 nm,  $t_{M+S}$  = 12.52 min,  $t_M$  (DMSO) = 1.25 min.

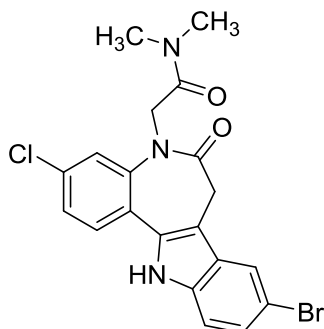
*N*-(4-Aminobutyl)-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetamid Hydrochlorid (**36s**)



Es wurde nach der AAV4 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus *tert*-Butyl-{4-[2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetamido]but-yl}carbamat (**36r**, 12.0 mg, 20.3  $\mu$ mol), getrocknetem Dichlormethan (12 mL), Trifluoressigsäure (2.3 mL), Propan-2-ol (3 mL), 10 Tropfen propan-2-olischer HCl und Diethylether (30 mL). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten (10 mg, 94%).

Zers.: ab 261 °C; IR (KBr): 3414  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3288  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1657  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1637  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.06 (s, 1H, Indol-NH), 8.19 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, -NH), 7.94 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H; ArH), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.73 (bs, 3H, -NH $_3^+$ ), 7.68 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 4.36 und 4.11 (bs, 2H, -N $^{\text{F}}$ -CH $_2$ ), 3.97 (bs, 1H, Azepin-CH $_2$ ), 3.11 (bs und bq, 3H, Azepin-CH $_2$  und -CH $_2$  überlagert), 2.79 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, -CH $_2$ ), 1.58–1.52 (m, 2H, -CH $_2$ ), 1.52–1.40 (m, 2H, -CH $_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 25.5, 27.1, 32.2, 39.1, 39.5, 54.7 (CH $_2$ ); 114.7, 121.7, 125.1, 126.0, 126.2, 129.7 (CH); 109.3, 111.8, 124.0, 127.7, 132.4, 133.0, 136.0, 141.2, 168.2, 170.1 (C); C $_{22}$ H $_{23}$ BrCl $_2$ N $_4$ O $_2$  (526.26); MS (EI):  $m/z$  (%): 490.0 [ $\text{M}^{+\bullet}$ -36] (16), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}$ -124] (100); HRMS (ESI):  $m/z$  (C $_{22}$ H $_{23}$ BrClN $_4$ O $_2$ , Monokation) ber. 491.06761, gef. 491.06587; HPLC (isokratisch) 96.8% bei 254 nm, 95.4% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 5.86 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer) = 30:70;  $\lambda_{\text{max}}$ : 231 nm, 319 nm, 382 nm.

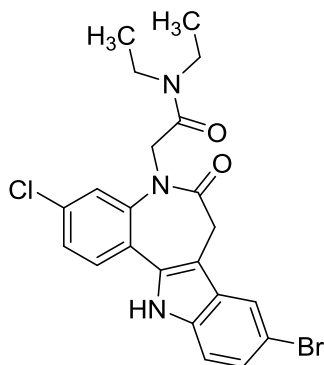
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N,N*-dimethylacetamid (36t)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 160 mg, 381  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (800  $\mu\text{L}$ , 4.59 mmol), PyBOP (254 mg, 488  $\mu\text{mol}$ ) und Dimethylamin Hydrochlorid (42 mg, 0.52 mmol) in DMF (1 mL). Der erhaltende Feststoff wurde erst aus Ethanol und anschließend aus Ethanol/Petrolether 1:1 umkristallisiert. Es wurde ein gelber Feststoff erhalten (23 mg, 14%).

Zers.: ab 301 °C; IR (KBr): 3432  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3286  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1664  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1643  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 7.95 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.54 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.47 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 4.70 und 4.35 (bs, 2H,  $-N^5\text{-CH}_2$ ), 3.97 und 3.07 (bs, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 2.95 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 2.85 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 35.2, 35.9 ( $\text{CH}_3$ ); 31.1, 52.2 ( $\text{CH}_2$ ); 109.4, 111.8, 124.1, 127.8, 132.4, 133.1, 136.0, 141.1, 167.5, 169.9 (C);  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{BrClN}_3\text{O}_2$  (446.73); CHN: ber. C 53.77, H 3.84, N 9.41, gef. C 54.17, H 3.62, N 9.11; MS (EI):  $m/z$  (%): 447.0  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (16), 401.9  $[\text{M}^{+\bullet}-270.1]$  (100); HPLC (isokratisch): 98.1% bei 254 nm, 99.5% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.83 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 50:50);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm, 391 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 98.3% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 11.46 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.25 min.

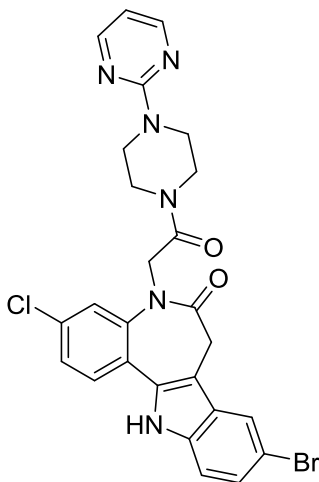
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N,N*-diethylacetamid (36u)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 291 mg, 693  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (1.40 mL, 8.04 mmol), PyBOP (442 mg, 849  $\mu\text{mol}$ ) und Diethylamin (86  $\mu\text{L}$ , 0.83 mmol) in DMF (1 mL). Der Feststoff wurde aus Ethanol und anschließend aus Ethanol/Diethylether 1:1 umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (23 mg, 7%).

Zers.: 279–281 °C; IR (KBr): 3293  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1665  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1642  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 7.94 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.58 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.47 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 4.68 und 4.36 (bs, 2H,  $-N^5\text{-CH}_2$ ), 3.29 (bq,  $J$  = 7.2 Hz, 4H,  $-\text{CH}_2$ ), 3.97 und 3.07 (bs, 1H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 1.11 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1.02 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H,  $-\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 13.0, 13.9 ( $\text{CH}_3$ ); 31.2, 40.0, 40.7, 52.0 ( $\text{CH}_2$ ); 113.6, 120.7, 123.9, 124.9, 125.0, 128.6 (CH); 109.4, 111.8, 124.1, 127.8, 132.4, 133.1, 136.0, 141.1, 166.7, 169.9 (C); CHN: ber. C 55.66, H 4.46, N 8.85, gef. C 55.45, H 4.42, N 8.64;  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{BrClN}_3\text{O}_2$  (474.78); MS (EI):  $m/z$  (%): 475.1 [ $\text{M}]^{+\bullet}$  (31), 402 [ $\text{M}^{+\bullet}-72.1$ ] (100); HPLC (isokratisch) 96.0% bei 254 nm, 96.1% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.08 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 233 nm, 232 nm, 319 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 95.1% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 12.48 min,  $t_{\text{M}}$ (DMSO) = 1.25 min.

9-Brom-3-chlor-5-{2-oxo-2-[4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl]ethyl}-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (36v)

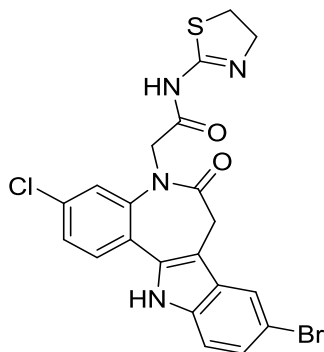


Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 211 mg, 503  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (400  $\mu\text{L}$ , 2.30 mmol), PyBOP (316 mg, 607  $\mu\text{mol}$ ) und 2-(Piperazin-1-yl)pyrimidin (75  $\mu\text{L}$ , 0.73  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein gelber Feststoff erhalten (107 mg, 38%).

Zers.: ab 275 °C; IR (KBr): 3277  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1644  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.00 (s, 1H, Indol -NH), 8.38 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 2H, ArH), 7.95 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.58 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.67 (t,  $J$  = 4.7 Hz, 1H, ArH), 4.79 und 4.50 (bs, 2H,  $-N^5\text{-CH}_2$ ), 3.99 und 3.09 (bs, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 3.80–3.62 (m, 4H, Piperazin- $\text{CH}_2$ ), 3.59–3.46 (m, 4H, Piperazin- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 30.9, 41.0, 42.9, 43.0, 43.7, 51.6 ( $\text{CH}_2$ ); 110.2, 113.4, 120.4, 123.8, 124.6, 124.9, 128.4, 157.7 (2C) (CH); 109.4, 111.8, 124.2, 127.8, 132.4, 133.2, 136.0, 140.9, 161.0, 166.6, 169.9 (C);  $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{BrClN}_6\text{O}_2$  (565.86); CHN: ber. C 55.19, H 3.92, N 14.85, gef. C 55.09, H 3.51, N 14.52; MS (EI):  $m/z$  (%): 566.0  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (22), 402.0  $[\text{M}^{+\bullet}-164]$  (100); HPLC (isokratisch): 98.8% bei 254 nm, 99.6% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 6.85 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 50:50);  $\lambda_{\text{max}}$ : 237 nm, 319 nm, 386 nm.



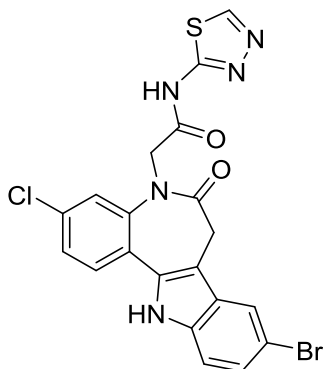
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl)acetamid (**36w**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 294 mg, 701  $\mu$ mol), DIPEA (1.02 mL, 5.86 mmol), PyBOP (441 mg, 847  $\mu$ mol) und 4,5-Dihydro-1,3-thiazol-2-amin (**53**, 61 mg, 0.60 mmol) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Ethylacetat) aufgereinigt. Der erhaltene Feststoff wurde anschließend aus Ethylacetat/Toluen 1:1 umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (40 mg, 13%).

Zers.: ab 266 °C; IR (KBr): 3289  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1722  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1650  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.01 (s, 1H, Indol-NH), 9.91 (bs, 1H, -NH), 7.96 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, ArH), 7.54 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, 1H, ArH), 7.42 (dd,  $J = 8.6, 0.5$  Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J = 8.6, 1.9$  Hz, 1H, ArH), 4.52 und 4.32 (bs, 1H, - $N^6$ -CH<sub>2</sub>), 3.92 und 3.08 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.67 (bt, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3.22 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 30.3 (bs), 31.1, 55.6 (bs) (CH<sub>2</sub>, 1 Signal nicht sichtbar); 113.6, 120.7, 123.8, 124.9, 125.1, 128.6 (CH); 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 132.5, 133.0, 136.0, 141.0, 170.1 (C, 1 Carbonylkohlenstoff-Signal und  $\text{sp}^2$ -hybridisierter Kohlenstoff des Thiazolins nicht sichtbar);  $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{BrClN}_4\text{O}_2\text{S}$  (503.79); MS (EI):  $m/z$  (%): 504.0 [ $\text{M}^{+\bullet}$ ] (2), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-102$ ] (48), 129.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-375$ ] (100), HRMS (ESI):  $m/z$  ( $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{BrClN}_4\text{O}_2\text{SNa}$ , Monokation) ber. 526.97367, gef. 526.97349; HPLC (isokratisch) 96.2% bei 254 nm, 96.4% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 3.66 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 50:50);  $\lambda_{\text{max}}$ : 230 nm, 319 nm, 384 nm.

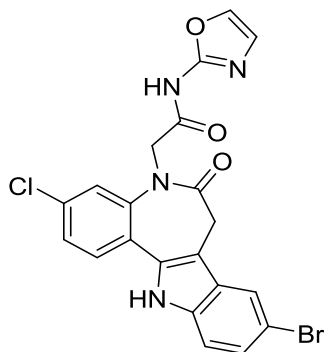
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamid (**36x**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 296 mg, 705  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (510  $\mu\text{L}$ , 2.93 mmol), PyBOP (442 mg, 849  $\mu\text{mol}$ ) und 2-Amino-1,3,4-thiadiazol (84 mg, 0.83 mmol) in DMF (1 mL). Der erhaltende Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (99 mg, 28%).

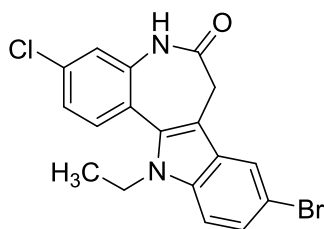
Zers.: ab 304 °C; IR (KBr): 3330  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1712  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1655  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.86 (s, 1H, -NH), 12.05 (s, 1H, Indol-NH), 9.20 (s, 1H, ArH), 7.97 (d,  $J$  = 1.9 Hz 1H, ArH), 7.75 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.68 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.51 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.44 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.31 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 4.66 (bs, 2H, - $N^5$ -CH $_2$ ), 4.00 und 3.15 (bs, 1H, Azepin-CH $_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 30.9, 53.8 (CH $_2$ ); 113.7, 120.8, 124.2, 125.0, 125.5, 128.7, 148.8 (CH); 109.2, 111.9, 124.1, 127.8, 132.6, 133.0, 136.0, 140.6, 158.5, 168.2, 170.6 (C); CHN: ber. C 47.78, H 2.61 N 13.93, gef. C 47.60, H 2.59, N 13.51;  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{BrClN}_5\text{O}_2\text{S}$  (502.77); MS (EI):  $m/z$  (%): 502.9  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (22), 401.9  $[\text{M}^{+\bullet}-101]$  (100); HPLC (isokratisch) 98.6% bei 254 nm, 98.8% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.33 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 50:50);  $\lambda_{\text{max}}$ : 234 nm, 319 nm, 385 nm.

2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-(1,3-oxazol-2-yl)acetamid (36y)



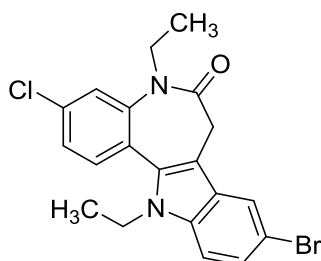
Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**51**, 301 mg, 717  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (1.02 mL, 5.86 mmol), PyBOP (444 mg, 853  $\mu\text{mol}$ ) und 2-Amino-1,3-oxazol (51 mg, 0.60 mmol) in DMF (1 mL). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (25 mg, 7%).

Zers.: ab 288 °C; IR (KBr): 3429  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1694  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1643  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.02 (s, 1H, Indol-NH), 11.53 (s, 1H, -NH), 7.97 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.87 (d,  $J$  = 1.0 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.63 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.50 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.10 (d,  $J$  = 1.0 Hz, 1H, ArH), 4.51 (bs, 2H, - $\text{N}^5\text{-CH}_2$ ), 4.00 und 3.13 (bs, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 30.7, 53.7 ( $\text{CH}_2$ ); 113.4, 120.5, 123.9, 124.7, 125.1, 126.4, 128.4, 135.8 (CH); 109.2, 111.9, 124.1, 127.8, 132.6, 133.0, 136.0, 140.7, 152.9, 167.0 (bs), 170.4 (C);  $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{BrClN}_4\text{O}_3$  (485.72); MS (EI):  $m/z$  (%): 486.0 [ $\text{M}]^{+\bullet}$  (16), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-84$ ] (100); HRMS (EI):  $m/z$  [ $\text{M}]^{+\bullet}$  ber. 483.99323, gef. 483.99294; HPLC (isokratisch) 96.7% bei 254 nm, 96.8% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 3.93 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 50:50);  $\lambda_{\text{max}}$ : 232 nm, 319 nm.

9-Brom-3-chlor-12-ethyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (37a)

Es wurde nach der AAV3 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**32**, 310 mg, 857  $\mu\text{mol}$ ), KOH (30 mg, 0.54 mmol) und Iodethan (1.60 g, 10.3 mmol) in getrocknetem Aceton (100 mL). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Ethylacetat 95:5). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten (2. Fraktion, 32 mg, 10%).

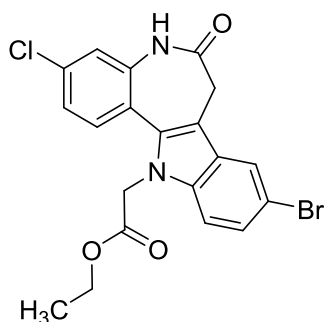
Schmp.: 316–317 °C; IR (KBr): 3430  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1662  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 10.16 (s, 1H, Lactam-NH), 7.98 (dd,  $J$  = 2.0, 0.5 Hz, 1H, ArH), 7.70 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.59 (dd,  $J$  = 8.7, 0.5 Hz, 1H, ArH), 7.43–7.31 (m, 3H, ArH), 4.31 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, - $N^{12}$ -CH $_2$ ), 3.82 und 3.11 (bs, 2H, Azepin-CH $_2$ ), 1.23 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, -CH $_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 15.3 (CH $_3$ ); 31.2, 39.5 (CH $_2$ ); 113.1, 121.1, 122.7, 124.0, 125.4, 130.1 (CH); 110.4, 112.4, 120.5, 127.3, 132.6, 133.6, 136.8, 137.8, 172.5 (C); CHN: ber. C 55.48, H 3.62, N 7.19, gef. C 55.51, H 3.55, N 6.93; C $_{18}$ H $_{14}$ BrClN $_2$ O (389.68); MS (EI):  $m/z$  (%): 390.0 [ $M$ ] $^{+\bullet}$  (54), 361.0 [ $M$ ] $^{+\bullet}-29$  (100); HPLC (isokrat.) 99.7% bei 254 nm, 99.8% bei 280 nm,  $t_{M+S}$  = 7.58 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 233 nm, 315 nm, 386 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 95.3% bei 254 nm,  $t_{M+S}$  = 13.45 min,  $t_M$ (DMSO) = 1.25 min.

9-Brom-3-chlor-5,12-diethyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (37b)

Es wurde nach der AAV3 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**32**, 310 mg, 857  $\mu$ mol), KOH (30 mg, 0.54 mmol) und Iodethan (1.60 g, 10.3 mmol) in getrocknetem Aceton (100 mL). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Ethylacetat 95:5). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten (1. Fraktion, 48 mg, 13%).

Schmp.: 175–176 °C; IR (KBr): 1674  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.98 (dd,  $J$  = 2.0, 0.5 Hz, 1H, ArH), 7.84 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.76 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.62 (dd,  $J$  = 8.9, 0.5 Hz, 1H, ArH), 7.49 (dd,  $J$  = 8.5, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.37 (dd,  $J$  = 8.7, 2.0 Hz, 1H, ArH), 4.43 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 4.21 (dq,  $J$  = 14.2, 7.1 Hz, 1H), 3.89 (d,  $J$  = 13.9 Hz, 1H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 3.58 (dq,  $J$  = 14.0, 7.0 Hz, 1H), 2.94 (d,  $J$  = 13.8 Hz, 1H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 1.09 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 0.71 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H,  $-\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 13.3, 15.3 ( $\text{CH}_3$ ); 32.1, 39.5, 43.7 ( $\text{CH}_2$ ); 113.4, 121.6, 125.6, 125.9, 126.2, 130.1 (CH); 112.3, 112.6, 124.7, 127.1, 132.9, 133.2, 136.7, 140.5, 169.9 (C); CHN: ber. C 57.48, H 4.34, N 6.71, gef. C 57.73, H 4.27, N 6.54;  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{BrClN}_2\text{O}$  (417.73); MS (EI):  $m/z$  (%): 418.0  $[\text{M}]^{+}$  (51), 389.0  $[\text{M}^{+}-29]$  (100), 361.0  $[\text{M}^{+}-57]$  (12); HPLC (isokratisch) 97.2% bei 254 nm, 97.8% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 5.20 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 70:30);  $\lambda_{\text{max}}$ : 235 nm, 316 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 96.1% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 14.63 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.25 min.

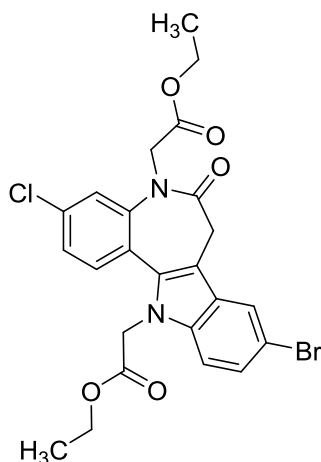
Ethyl-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-12-yl)acetat  
(**37c**)



Es wurde nach der AAV3 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**32**, 314 mg, 868  $\mu$ mol), KOH (58 mg, 1.0 mmol) und Ethyl-2-bromacetat (1.72 g, 10.3 mmol) in getrocknetem Aceton (100 mL). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Ethylacetat 6:1). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten (8 mg, 2%).

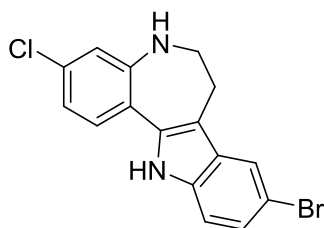
Schmp.: 231–232 °C; IR (KBr): 3458  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1738  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1656  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 10.21 (s, 1H, Lactam-NH), 8.01 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.55 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.51 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.38 (dd,  $J$  = 8.7, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.37–7.33 (m, 2H, ArH), 5.17 (s, 2H,  $-N^{12}\text{-CH}_2$ ), 4.09 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H,  $-\text{O-CH}_2$ ), 3.85 und 3.14 (bs, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 1.12 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $-\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 13.9 ( $\text{CH}_3$ ), 31.1, 46.3, 61.2 ( $\text{CH}_2$ ), 112.6, 120.8, 122.3, 123.6, 125.3, 129.2 (CH), 110.7, 112.8, 120.1, 127.3, 132.8, 134.2, 137.95, 137.97, 168.8, 172.3 (C); CHN: ber. C 53.65, H 3.60, N 6.26, gef. C 53.44, H 3.41, N 6.09;  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{BrClN}_2\text{O}_3$  (447.71); MS (EI):  $m/z$  (%): 448.0  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (100), 361.0  $[\text{M}^{+\bullet}-87]$  (73); HPLC (isokratisch) 97.0% bei 254 nm, 96.1% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.33 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 233 nm, 317 nm, 376 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 96.9% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 12.67 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.25 min.

Diethyl-2,2'-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5,12-di-yl)diacetat (**37d**)



Die Synthese erfolgte unter Stickstoff. Zu einer auf dem Eisbad gerührten Suspension aus 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**32**, 362 mg, 1.00 mmol) in getrocknetem Aceton (120 mL) wurde Kalium-*tert*-butylat (112 mg, 1.00 mmol) hinzugegeben und die Lösung wurde für 1 h weitergerührt. Nach Zugabe von Ethyl-2-bromacetat (1.67 g, 10.0 mmol) wurde für 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Wasser (120 mL) wurde der resultierende Niederschlag abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen und säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat/Petrolether 1:1). Es wurde ein gelber Feststoff erhalten (8 mg, 2%).

Zers.: ab 141 °C; IR (KBr): 1742 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1679 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1662 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8.03 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.66 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.56–7.45 (m, 3H, ArH), 7.39 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H, ArH), 5.20 (d, *J* = 18.3 Hz, 1H, *N*<sup>12</sup>-CH<sub>2</sub>), 5.11 (d, *J* = 18.3 Hz, 1H, -*N*<sup>12</sup>-CH<sub>2</sub>), 4.44 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H, -*N*<sup>6</sup>-CH<sub>2</sub>), 4.37 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H, -*N*<sup>6</sup>-CH<sub>2</sub>), 4.21–4.13 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4.13–4.04 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3.99 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.10 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 1.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.11 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 13.9, 14.0 (CH<sub>3</sub>); 30.8, 46.3, 51.9, 60.8, 61.4 (CH<sub>2</sub>); 112.7, 120.9, 124.4, 125.5, 125.7, 129.0 (CH); 111.5, 112.9, 122.7, 126.9, 133.2, 134.0, 137.6, 141.5, 168.8, 169.3, 170.9 (C); CHN: ber. C 54.00, H 4.15, N 5.25, gef. C 53.99, H 4.16, N 5.06; C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>BrClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (533.80); MS (EI): *m/z* (%): 534.0 [M]<sup>+</sup>• (100); HPLC (isokratisch) 99.7% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 7.79 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40); λ<sub>max</sub>: 232 nm, 315 nm, 380 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 97.5% bei 254 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 13.73 min, *t*<sub>M</sub>(DMSO) = 1.25 min.

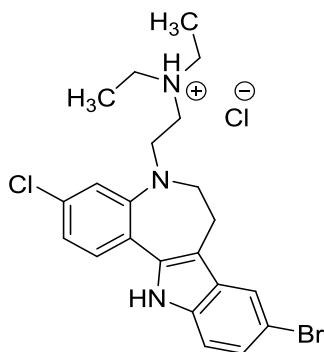
9-Brom-3-chlor-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol (38a)

Zu einer Suspension aus  $\text{LiAlH}_4$  (16.0 mg, 422  $\mu\text{mol}$ ) in getrocknetem Tetrahydrofuran (10 mL) wurde eine Lösung aus 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**32**, 98.0 mg, 271  $\mu\text{mol}$ ) in getrocknetem Tetrahydrofuran (10 mL) bei Raumtemperatur und unter Rühren hinzu getropft. Die Suspension wurde für 7 h unter Verwendung eines Metallkühlers refluxiert und stündlich wurde  $\text{LiAlH}_4$  (30 mg, 0.79 mmol) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und Wasser vorsichtig tropfenweise hinzugesetzt, bis sich die Wasserstoffproduktion eingestellt hatte. Der weiße Niederschlag wurde durch Zugabe von 25%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst und die Lösung mit Dichlormethan zweimal (jeweils 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck abdestilliert. Der verbleibende Feststoff wurde säulenchromatographisch (Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 1:1) gereinigt. Anschließend wurde der Feststoff aus Ethanol/Petrolether 1:1 umkristallisiert. Es wurden farblose Kristalle erhalten (40 mg, 42%).

Schmp.: 154–155 °C; IR (KBr): 3450  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3387  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.24 (s, 1H, Indol-NH), 7.77 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.59 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.29 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.19 (dd,  $J$  = 8.5, 1.9 Hz, 1H, ArH), 6.91 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.83 (dd,  $J$  = 8.5, 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.56 (bs, 1H, -NH), 3.33–3.28 (m, 2H,  $-\text{CH}_2$  mit dem Wasser-Signal überlagert), 3.05–2.97 (m, 2H,  $-\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 27.9, 43.2 ( $\text{CH}_2$ ); 112.4, 117.1, 117.4, 120.1, 123.9, 127.5 (CH); 111.1, 112.9, 116.3, 130.7, 131.5, 133.0, 134.7, 150.4 (C);  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrClN}_2$  (347.64); MS (EI):  $m/z$  (%): 348.0  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (100); HRMS (ESI):  $m/z$  ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BrClN}_2$ , Monokation) ber. 348.99225, gef. 348.99190; HPLC (isokratisch): 98.7% bei 254 nm, 98.8% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 4.20 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 70:30);  $\lambda_{\text{max}}$ : 235 nm, 351 nm, 317 nm.

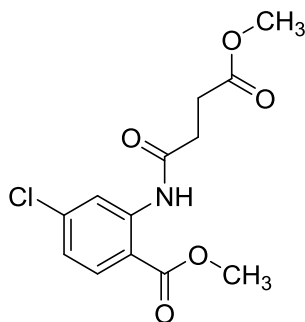


2-(9-Brom-3-chlor-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(6*H*)-yl)-*N,N*-diethylethan-1-amin Hydrochlorid (**38b**)



LiAlH<sub>4</sub> (16.0 mg, 422 µmol) wurde zu einer Lösung aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(6*H*)-yl)-*N,N*-diethylacetamid (**36u**, 24 mg, 51 µmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (7 mL) gegeben und der Ansatz unter Verwendung eines Metallkühlers zum Reflux erhitzt. Nach 30 min wurde erneut LiAlH<sub>4</sub> (50 mg, 1.3 mmol) zum Ansatz hinzugeben und die Suspension für 2 h weiter refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Wasser vorsichtig tropfenweise hinzugesetzt bis sich die Wasserstoffproduktion eingestellt hatte. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der verbleibende Feststoff säulenchromatographisch (Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 1:1 unter Zusatz von 5% Triethylamin) gereinigt. Das resultierende Öl wurde in Propan-2-ol (2 mL) aufgenommen, mit 11 Tropfen propan-2-olischer HCl versetzt und in Diethylether (50 mL) gegeben. Die Suspension wurde 1 h zum Reflux erhitzt und der Niederschlag abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und getrocknet. Es wurde ein gelbes Pulver erhalten (7 mg, 26%).

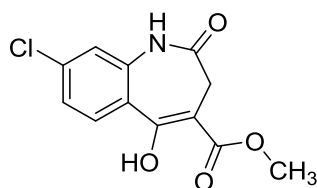
Zers.: 236–237 °C; IR (KBr): 3428 cm<sup>-1</sup> (NH), 3203 cm<sup>-1</sup> (NH); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 11.26 (s, 1H, Indol-NH), 9.28 (s, 1H, -NH<sup>+</sup>), 7.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.66 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.33 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.24 (dd, *J* = 8.5, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.20 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.13 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, ArH), 3.75 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3.32–3.24 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 3.25–3.10 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 3.08 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 1.14 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, -CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8.2 (2C) (CH<sub>3</sub>); 27.2, 46.4 (2C), 47.1, 48.6, 51.9 (CH<sub>2</sub>); 112.6, 116.9, 120.4, 120.5, 124.5, 128.0 (CH); 111.1, 113.2, 116.4, 121.6, 130.4, 132.1, 132.5, 134.9 (C); C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>3</sub> (483.28); MS (EI): *m/z* (%): 447.0 [M<sup>•+</sup>-36] (19), 360.0 [M<sup>•+</sup>-87] (100); HRMS (ESI): *m/z* (C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>BrClN<sub>3</sub>, Monokation) ber. 448.09757, gef. 448.09706; HPLC (isokratisch): 98.0% bei 254 nm, 98.2% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 3.05 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 50:50); λ<sub>max</sub>: 239 nm, 339 nm.

2-[(4-Methoxy-4-oxobutanoyl)amino]-4-chlorbenzoesäuremethylester (40)

Eine Lösung aus 2-Amino-4-chlorbenzoesäuremethylester (**39**, 5.12 g, 27.5 mmol) in getrocknetem Toluol (47 mL) wurde mit Pyridin (3 mL) versetzt. Die resultierende Lösung wurde auf dem Eisbad gekühlt und mit einer Lösung aus Bernsteinsäuremethylesterchlorid (4.00 mL, 33.8 mmol) in getrocknetem Toluol (14 mL) tropfenweise versetzt. Der Reaktionsansatz wurde auf 80 °C erhitzt und 2 h gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und zweimal mit Toluol gewaschen. Das Filtrat wurde dreimal mit jeweils 30 mL 10%iger wässriger Salzsäure, 10%iger wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde aus Methanol umkristallisiert. Es wurden nadelförmige, farblose Kristalle erhalten (7.37 g, 89%).

Schmp.: 94–95 °C (Lit.<sup>163</sup>: 94–95 °C); IR (KBr): 3441 cm<sup>-1</sup> (NH), 3291 cm<sup>-1</sup> (NH), 3256 cm<sup>-1</sup> (NH), 1729 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1704 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1685 cm<sup>-1</sup> (C=O) <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 10.73 (s, 1H, -NH), 8.39 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.26 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, ArH), 3.87 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.61 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 2.71 (ddd, *J* = 7.1, 5.9, 1.3 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 2.63 (ddd, *J* = 7.2, 5.8, 1.3 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 51.4, 52.6 (CH<sub>3</sub>); 28.3, 31.7 (CH<sub>2</sub>); 120.1, 123.0, 132.3 (CH); 115.8, 138.4, 140.7, 166.9, 170.5, 172.5 (C), CHN: ber. C 52.10, H 4.71, N 4.67, gef. C 52.14, H 4.65, N 4.61, C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub>Cl (299.71).

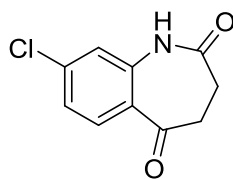
Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>163</sup>

8-Chlor-5-hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäuremethylester (41)

Zu einer eisgekühlten Suspension aus Kalium-*tert*-butylat (1.53 g, 13.6 mmol) in getrocknetem Toluol (4 mL) wurde eine Lösung aus 2-[(4-Methoxy-4-oxobutanoyl)amino]-4-chlorbenzoesäuremethylester (**40**, 1.06 g, 3.60 mmol) in getrocknetem Toluol (8 mL) und DMF (1.2 mL) unter Stickstoff hinzu getropft. Die Suspension wurde auf 80 °C erhitzt und für 3.5 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden Eisessig (800 µL) und Wasser (8 mL) nacheinander hinzugefügt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit viel Wasser und anschließend mit Petrolether gewaschen. Der Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurden feine farblose Kristalle erhalten (626 mg, 65%).

Schmp.: 257–260 °C (Lit.<sup>163</sup>: 266–267 °C (Zers.)); IR (KBr): 3427 cm<sup>-1</sup> (OH), 3196 cm<sup>-1</sup> (NH), 1675 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1614 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 12.40 (s, 1H, -OH), 10.45 (s, 1H, -NH), 7.81 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.33 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.24 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 3.84 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 2.97 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 30.7 (CH<sub>3</sub>), 52.6 (CH<sub>2</sub>); 120.9, 123.5, 130.1 (CH); 96.1, 123.6, 136.0, 139.1, 165.1, 170.6, 171.8 (C); CHN: ber. C 53.85, H 3.77, N 5.23, gef. C 53.93, H 3.71, N 5.19; C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClNO<sub>4</sub> (267.67).

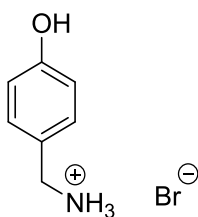
Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>163</sup>

8-Chlor-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (42)

Eine Suspension aus 8-Chlor-5-hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäuremethylester (**41**, 418 mg, 1.56 mmol) in Dimethylsulfoxid (28 mL) wurde unter Stickstoff mit Wasser (3 mL) versetzt und für 6 h bei 150 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung auf Wasser (30 mL) gegossen und über Nacht im Kühlschrank gelagert, wobei sich Kristalle bildeten, die abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert wurden. Es wurden hellgrüne Kristalle erhalten (173 mg, 53%).

Schmp.: 216–218 °C (Lit.<sup>163</sup>: 209–212 °C (Zers.)); IR (KBr): 3212 cm<sup>-1</sup> (NH), 1664 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 10.20 (s, 1H, Lactam-NH), 7.89–7.81 (m, 1H, ArH), 7.27–7.20 (m, 2H, ArH), 2.95–2.87 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 2.73–2.65 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 29.0, 37.7 (CH<sub>2</sub>); 120.8, 123.2, 132.4 (CH); 125.2, 138.4, 140.5, 173.4, 197.4 (C); CHN: ber. C 57.30, H 3.85, N 6.68, gef. C 57.43, H 3.70, N 6.62; C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>Cl (209.63).

Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>163</sup>

4-Hydroxybenzylamin Hydrobromid (47)

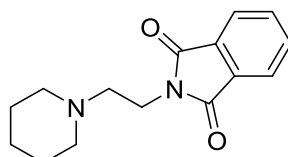
4-Methoxybenzylamin (2.40 mL, 17.7 mmol) wurde mit 48%iger Bromwasserstoffsäure (10 mL, 87 mmol) versetzt und 17 h bei 130 °C zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz erst auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend im Eisbad gerührt. Die ausgefallenen Kristalle wurden abgesaugt. Nach Waschen mit Ethylacetat wurden farblose Kristalle erhalten (2.58 g, 72%).

Schmp.: 212–213 °C (Lit.<sup>166</sup>: 175–180 °C); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 9.60 (s, 1H, Phenol-OH), 8.08 (s, 3H, -NH<sub>3</sub>), 7.46–7.15 (m, 2H, ArH), 6.95–6.66 (m, 2H, ArH), 3.91

(s, 2H, -CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 41.9 (CH<sub>2</sub>); 115.3 (2C), 130.5 (2C) (CH); 124.0, 157.6 (C); C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>BrNO (204.07).

Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>167</sup>

#### 2-[2-(Piperidin-1-yl)ethyl]isoindolin-1,3-dion (49a)

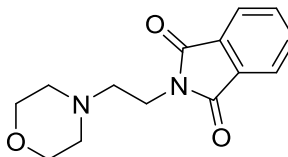


Es wurde nach der AAV5 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus Piperidin (**48a**, 990 µL, 10.0 mmol) und *N*-(2-Bromethyl)phthalimid (2.20 g, 8.66 mmol). Bei der säulenchromatographischen Aufreinigung wurde eine Gradientenelution durchgeführt (Ethylacetat/Petrolether 1:1 zu reinem Ethylacetat). Es wurden gelbe Kristalle erhalten (490 mg, 22%).

Schmp.: 85–88 °C (Lit.<sup>168</sup>: 105 °C); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 7.98–7.74 (m, 2H, ArH), 3.68 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 2.48 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>), 2.41–2.28 (m, 4H, Piperidin-CH<sub>2</sub>), 1.47–1.26 (m, 6H, Piperidin-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 23.9, 25.5 (2C), 35.1, 53.8 (2C), 55.7 (CH<sub>2</sub>); 122.9 (2C), 134.3 (2C) (CH); 131.6 (2C), 167.8 (2C) (C); C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (258.32).

Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>168</sup>

#### 2-(2-Morpholinoethyl)isoindolin-1,3-dion (49b)



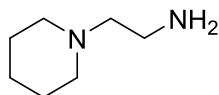
Es wurde nach der AAV5 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus Morpholin (**48b**, 880 µL, 10.2 mmol) und *N*-(2-Bromethyl)phthalimid (2.20 g, 8.66 mmol). Es wurde eine Gradientenelution durchgeführt (Ethylacetat/Petrolether 1:1 zu reinem Ethylacetat). Es wurden farblose Kristalle erhalten (1.29 g, 49%).

Schmp.: 128–132 °C (Lit.<sup>169</sup>: 129–131 °C); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 7.94–7.79 (m, 4H, ArH), 3.70 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3.53–3.46 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 2.55–2.50 (m, 2H,

-CH<sub>2</sub>, Überlagerung mit dem DMSO-Signal), 2.40 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 34.6, 53.0 (2C), 55.5, 66.1 (2C) (CH<sub>2</sub>); 123.0 (2C), 134.4 (2C) (CH); 131.5 (2C), 167.8 (2C) (C); C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (260.29).

Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>169</sup>

#### 2-(Piperidin-1-yl)ethan-1-amin (50a)

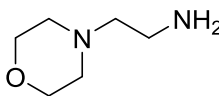


Es wurde nach der AAV6 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-[2-(Piperidin-1-yl)ethyl]isoindolin-1,3-dion (**49a**, 421 mg, 1.63 mmol), und Hydrazin-Monohydrat (313 µL, 6.43 mmol) in Ethanol (10 mL). Es wurde ein oranges Öl erhalten (380 mg, quantitative Ausbeute).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 2.61 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 2.37–2.29 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 2.29–2.21 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 1.48 (p, *J* = 5.5 Hz, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1.42–1.29 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 24.0, 24.1, 25.5, 25.6, 36.2, 54.0, 54.2, 57.8 (CH<sub>2</sub>); C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> (126.20).

Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>170</sup>

#### 2-Morpholinoethan-1-amin (50b)

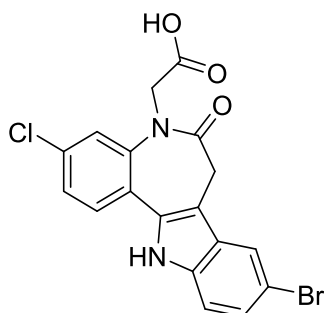


Es wurde nach der AAV6 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(2-Morpholinoethyl)isoindolin-1,3-dion (**49b**, 1.00 g, 3.84 mmol) und Hydrazin-Monohydrat (740 µL, 15.2 mmol) in Ethanol (15 mL). Es wurde ein oranges Öl erhalten (500 mg, quantitative Ausbeute).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 3.56 (t, *J* = 4.0 Hz, 4H, Morpholin-CH<sub>2</sub>), 2.61 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>), 2.37–2.31 (m, 4H, Morpholin-CH<sub>2</sub>), 2.28 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 39.5, 54.7 (2C), 62.6, 67.4 (2C) (CH<sub>2</sub>); C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O (130.19).

Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>171</sup>

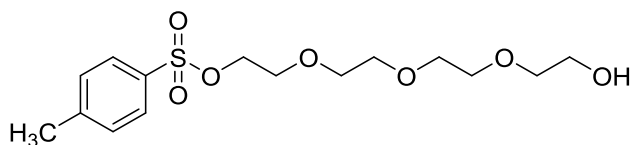
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure  
(51)



Unter Stickstoff wurde eine Suspension aus *tert*-Butyl-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetat (**36c**, 450 mg, 946  $\mu$ mol) in getrocknetem Dichlormethan (46 mL) mit Trifluoressigsäure (3 mL) versetzt. Die Lösung wurde für 22 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der orange Feststoff wurde in Diethylether (5 mL) suspendiert und 1 h zum Reflux erhitzt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit etwas Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet. Es wurde ein gelbes Pulver erhalten (396 mg, quantitativer Umsatz).

Zers.: 208–209 °C (Lit.<sup>109</sup>: 207–208 °C); IR (KBr): 3325  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1736  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1655  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.63 (bs, 1H, -COOH), 12.00 (s, 1H, Indol-NH), 7.96 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.58 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.49 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 4.37 (s, 2H, - $N^5$ -CH $_2$ ), 3.99 und 3.11 (bs, 2H, Azepin-CH $_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.0, 52.3 (CH $_2$ ); 113.4, 120.5, 123.5, 124.6, 125.0, 128.4 (CH); 109.2, 111.8, 124.1, 127.8, 132.5, 133.0, 136.0, 140.6, 170.3, 170.7 (C); C $_{18}$ H $_{12}$ BrClN $_2$ O $_3$  (419.66).

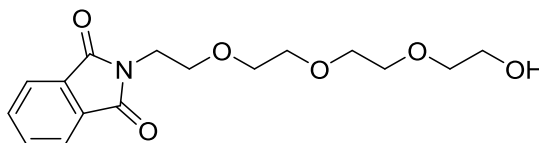
Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>109</sup>

{2-[2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy]ethyl}-4-methylbenzensulfonat (**63**)

Zu einer eiskühlten Lösung aus DMAP (200 mg, 1.64 mmol), Triethylamin (6.30 mL, 44.0 mmol) und Tetraethylenglykol (**62**, 80.0 g, 412 mmol) in Dichlormethan (200 mL) wurde 4-Methylbenzensulfonylchlorid (15.3 g, 80.3 mmol) hinzu gefügt. Anschließend wurde 8 h unter Eiskühlung und dann 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde zweimal mit 1 M HCl (50 mL) und dann einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung (50 mL) gewaschen und die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Einengen unter vermindertem Druck wurde der ölige Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (8.40 g, 27%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.83–7.76 (m, 2H, ArH), 7.52–7.45 (m, 2H, ArH), 4.16–4.10 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.62–3.55 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.53–3.47 (m, 6H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.45 (bs, 4H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.44–3.38 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2$ ), 2.43 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 21.0 ( $\text{CH}_3$ ); 60.1, 67.8, 69.56, 69.61, 69.65, 69.72, 69.9, 72.2 ( $\text{CH}_2$ ); 127.5 (2C), 130.0 (2C) (CH); 132.4, 144.9 (C);  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{S}$  (348.41).

Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>172</sup>

2-[2-[2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy]ethyl]isoindolin-1,3-dion (**64**)

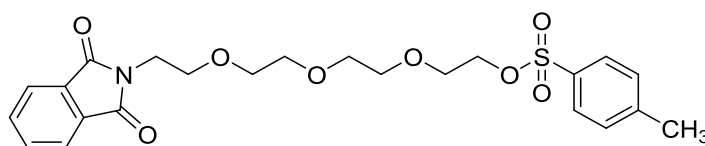
Eine Lösung aus {2-[2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy]ethyl}-4-methylbenzensulfonat (**63**, 4.23 g, 12.1 mmol) und Phthalimid-Kalium (2.42 g, 13.1 mmol) in DMF (35 mL) wurde für 8 h bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der verbleibende Rückstand wurde in Ethylacetat (100 mL) gelöst. Die organische Lösung wurde zweimal mit 1 M HCl (50 mL) und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung (50 mL) gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Das resultierende Öl wurde säulenchromatographisch mittels Gradientenelution (Ethylacetat/Petrolether 1:1 zu reinem Ethylacetat) gereinigt. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (1.40 g, 37%).



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.90–7.83 (m, 4H, ArH), 4.55 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, -OH), 3.79–3.71 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.67–3.60 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.55–3.49 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.48–3.35 (m, 10H,  $-\text{OCH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 37.0, 60.1, 66.8, 69.4, 69.5, 69.6, 69.7, 72.2 ( $\text{CH}_2$ ); 122.9 (2C), 134.4 (2C) (CH); 131.4 (2C), 167.7 (2C) (C);  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_6$  (311.33).

Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>172</sup>

{2-[2-(2-(2-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy]ethyl}-4-methylbenzensulfonat (65)

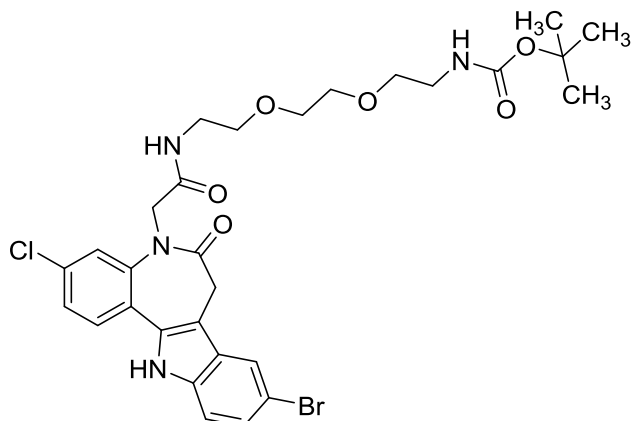


Zu einer eisgekühlten Lösung aus DMAP (34.1 mg, 279  $\mu\text{mol}$ ), Triethylamin (626  $\mu\text{L}$ ) und 2-{2-[2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy]ethyl}isindolin-1,3-dion (**64**, 1.40 g, 4.50 mmol) in Dichlormethan (25 mL) wurde 4-Methylbenzensulfonylchlorid (864 mg, 4.53 mmol) hinzu gefügt. Anschließend wurde 8 h unter Eiskühlung und dann 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde zweimal mit 1 M HCl (50 mL) und dann einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung (50 mL) gewaschen und die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Einengen unter vermindertem Druck wurde der ölige Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat). Es wurde ein gelbes Öl erhalten (1.50 g, 70%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.92–7.81 (m, 4H, ArH), 7.80–7.74 (m, 2H, ArH), 7.50–7.44 (m, 2H, ArH), 4.10–4.06 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.74 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.61 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.53–3.51 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.51–3.48 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.43–3.40 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2$ ), 3.38–3.33 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2$ ), 2.41 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 20.8 ( $\text{CH}_3$ ); 36.8, 66.7, 67.6, 69.2, 69.4 (3C), 69.7 ( $\text{CH}_2$ ); 122.8 (2C), 127.4 (2C), 129.9 (2C), 134.2 (2C) (CH); 131.5 (2C), 132.4, 144.9, 167.8 (2C) (C);  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_8\text{S}$  (477.53).

Die spektralen Parameter entsprechen den Angaben in der Literatur.<sup>172</sup>

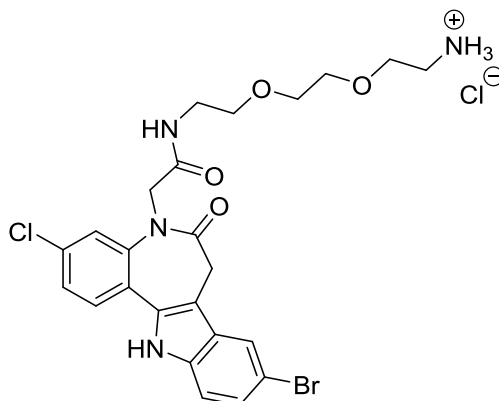
*tert*-Butyl-{2-[2-(2-(2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetamido)ethoxy)ethoxy]ethyl}carbamate (**68**)



Es wurde nach der AAV1 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**32**, 215 mg, 512  $\mu\text{mol}$ ), PyBOP (316 mg, 607  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (450  $\mu\text{L}$ , 2.58 mmol) und *tert*-Butyl-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}carbamate (**67**, 151 mg, 607  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (1 mL). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung mittels Gradientenelution (Ethylacetat/Petrolether 1:1 zu reinem Ethylacetat) und anschließender Umkristallisation aus Ethanol wurde ein gelbes Pulver erhalten (157 mg, 47%).

Schmp.: 210–215 °C; IR (KBr): 3334  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1681  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1656  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1641  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.18 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, -NH), 7.95 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.65 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.77 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H, Boc-NH), 4.40 und 4.10 (bs, 2H, -N<sup>5</sup>-CH<sub>2</sub>), 3.98 (bs, 1H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.51 (bs, 4H, -OCH<sub>2</sub>), 3.43 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 2H, -OCH<sub>2</sub>), 3.38 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 2H, -OCH<sub>2</sub>), 3.26 (q,  $J$  = 5.7 Hz, 2H, -OCH<sub>2</sub>), 3.06 (bs und q,  $J$  = 6.0 Hz, 3H, Azepin-CH<sub>2</sub> und -OCH<sub>2</sub>), 1.36 (s, 9H, -CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 28.2 (3C) (CH<sub>3</sub>); 31.9, 38.8, 39.7, 53.5, 69.0, 69.2, 96.5, 69.6 (CH<sub>2</sub>); 113.7, 120.8, 124.1, 124.9, 125.2, 128.6 (CH); 77.6, 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 132.5, 133.0, 136.0, 141.1, 155.6, 168.4, 170.1 (C); C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>BrClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (649.97); MS (EI):  $m/z$  (%): 650.1 [M]<sup>+</sup>• (25), 550.0 [M<sup>+</sup>•-100.1] (100); HRMS (ESI):  $m/z$  (C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Na, Monokation) ber. 673.12237, gef. 673.12247; HPLC (isokratisch) 99.2% bei 254 nm, 99.2% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 3.67 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40);  $\lambda_{\text{max}}$ : 236 nm, 229 nm, 318 nm; HPLC (Gradient-Methode B) 96.3% bei 254 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 12.16 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.25 min.

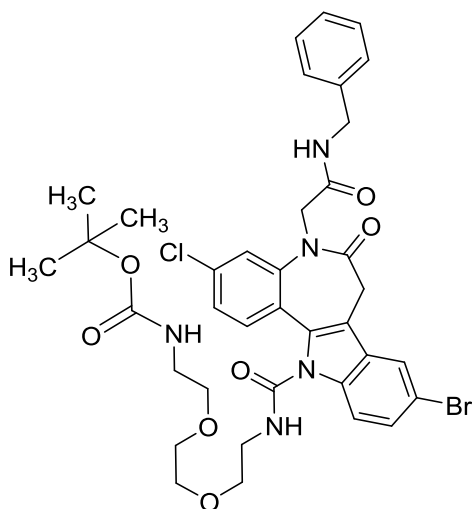
*N*-{2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethyl}-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetamid Hydrochlorid (**69**)



Es wurde nach der AAV4 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus *tert*-Butyl-{2-[2-(2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetamido)ethoxy)ethoxy]ethyl}carbamate (**68**, 140 mg, 215  $\mu$ mol), getrocknetem Dichlormethan (18 mL), Propan-2-ol (3 mL), Trifluoressigsäure (3.5 mL), 10 Tropfen propan-2-olischer HCl und Diethylether (50 mL). Es wurde ein farbloses Pulver erhalten (109 mg, 87%).

Zers.: ab 259 °C; IR (KBr): 3284  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1682  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1647  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.09 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, Indol -NH), 8.22 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, -NH), 7.95 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.91 (s, 3H, -NH<sub>3</sub>), 7.74 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.65 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.48 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.44 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 4.41 und 4.10 (bs, 2H, -N<sup>5</sup>-CH<sub>2</sub>), 3.97 (bs, 1H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.61 (dd,  $J$  = 5.8, 4.8 Hz, 2H, -OCH<sub>2</sub>), 3.60–3.53 (m, 4H, -OCH<sub>2</sub>), 3.45 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H, -OCH<sub>2</sub>), 3.27 (q,  $J$  = 5.9 Hz, 2H, -OCH<sub>2</sub>), 3.11 (bs, 1H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 2.96 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 2H, -OCH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.2, 38.6, 38.7, 53.6, 66.7, 68.9, 69.5, 69.7 (CH<sub>2</sub>); 113.7, 120.7, 124.0, 124.9, 125.2, 128.7 (CH); 109.4, 111.9, 124.0, 127.8, 132.4, 133.0, 136.1, 141.1, 168.4, 170.2 (C); C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (586.31); CHN: ber. C 49.17, H 4.64, N 9.56, gef. C 49.06, H 4.48, N 9.33; MS (EI):  $m/z$  (%): 550.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-36$ ] (21), 402.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-148$ ] (100); HPLC (isokratisch): 99.4% bei 254 nm, 99.8% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 2.53 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 40:60);  $\lambda_{\text{max}}$ : 231 nm, 319 nm, 380 nm.

*tert*-Butyl-{2-[2-(2-(5-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,7b,11a,12-hexahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-12-carboxamido)ethoxy)ethoxy)ethyl}carbamate (**74**)

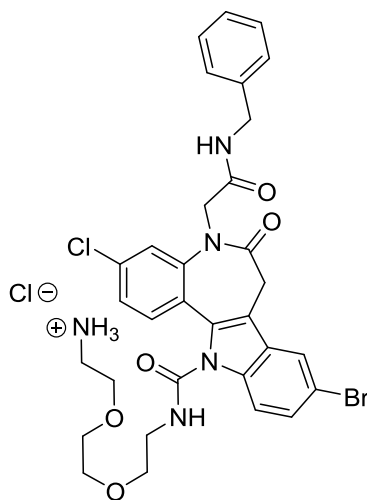


Für die Synthesen wurde eine Substanzprobe von **33** von KORN zur Verfügung gestellt.<sup>154</sup> Eine Suspension aus *N*-Benzyl-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(6*H*)-yl)acetamid (**33**, 127 mg, 250 µmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (30 mL) wurde mit DMAP (183 mg 1.50 mmol) und (4-Nitrophenyl)kohlen säureesterchlorid (**72**, 151 mg, 749 µmol) versetzt und unter Stickstoff bei Raumtemperatur 3 h gerührt. Der Ansatz wurde mit *tert*-Butyl-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}carbamate (**67**, 624 mg, 2.51 mmol) versetzt und unter Stickstoff bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Der resultierende Feststoff wurde in Dichlormethan (100 mL) gelöst, filtriert und erst mit 0.25 M HCl (100 mL) und dann mit Wasser (100 mL) gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Feststoff wurde säulenchromatographisch (Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 1:1) gereinigt. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (55 mg, 28%).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8.79 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, Benzylamid-NH), 8.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.87–7.77 (m, 3H, 2 ArH und -Harnstoff-NH), 7.49 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.44 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.39 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.30–7.25 (m, 2H, ArH), 7.24–7.20 (m, 1H, ArH), 7.15–7.09 (m, 2H, ArH), 6.74 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, -NH-Boc), 4.59 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H, -*N*<sup>5</sup>-CH<sub>2</sub>), 4.46 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H, -*N*<sup>5</sup>-CH<sub>2</sub>), 4.35 (dd, *J* = 15.3, 6.5 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>), 4.15 (dd, *J* = 15.3, 5.4 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>), 4.05 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.44–3.39 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>O), 3.31–3.26 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>O), 3.25–3.16 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>O), 3.09 (d, *J* = 14.2 Hz, 1H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.06–2.98 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>O), 1.35 (s, 9H, Boc), fehlende Signale (2 -CH<sub>2</sub>O) unter dem Wassersignal bei 3.34; <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 28.1 (3C) (CH<sub>3</sub>); 30.9, 40.1, 42.0, 51.7, 68.3, 69.2, 69.3, 69.4 (CH<sub>2</sub>, 1 Signal nicht

sichtbar); 115.0, 121.5, 124.6, 125.5, 126.80, 126.79 (2C), 127.1, 128.3 (2C), 129.6 (CH); 77.6, 114.6, 116.3, 124.7, 128.0, 132.2, 132.8, 136.2, 138.7, 140.9, 150.9, 155.6, 168.6, 170.0 (C);  $C_{37}H_{41}BrClN_5O_7$  (783.12).

*N*-{2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethyl}-5-[2-(benzylamino)-2-oxoethyl]-9-brom-3-chlor-6-oxo-6,7,7b,11a-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-12(5*H*)-carboxamid Hydrochlorid (**75**)

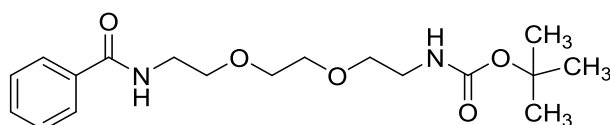


Eine Lösung aus *tert*-Butyl-{2-[2-(2-(5-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,7b,11a,12-hexahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-12-carboxamido)ethoxy)ethoxy]ethyl}carbamate (**74**, 54 mg, 69  $\mu$ mol) in getrocknetem Dichlormethan (9 mL) wurde mit Trifluoressigsäure (1 mL) versetzt, mit Argon überschichtet und 35 min bei Raumtemperatur gerührt. Das organische Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Das resultierende Öl wurde in Propan-2-ol (3 mL) gelöst und mit 10 Tropfen propan-2-olischer HCl versetzt. Zum Ansatz wurde Diethylether (40 mL) gegeben und 1 h zum Reflux erhitzt. Die organische Phase wurde abdekantiert und das resultierende Öl getrocknet. Es wurden braune Kristalle erhalten (40 mg, 80%).

Zers. ab 132 °C; IR (KBr): 3292  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1665  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.84 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, Benzylamid-NH), 8.14 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.83 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.81 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.75 (bs, 4H,  $-\text{NH}_3^+$  und Harnstoff-NH), 7.50 (dd,  $J$  = 8.8, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.45 (dd,  $J$  = 8.5, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.39 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.31–7.24 (m, 2H, ArH), 7.24–7.19 (m, 1H, ArH), 7.13–7.07 (m, 2H, ArH), 4.63 (d,  $J$  = 16.8 Hz, 1H,  $-\text{N}^5\text{-CH}_2$ ), 4.46 (d,  $J$  = 16.8 Hz, 1H,  $-\text{N}^6\text{-CH}_2$ ), 4.35 (dd,  $J$  = 15.4, 6.5 Hz, 1H,  $-\text{CH}_2$ ), 4.13 (dd,  $J$  = 15.4, 5.3 Hz, 1H,  $-\text{CH}_2$ ), 4.06 (d,  $J$  = 14.2 Hz, 1H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 3.58–3.52 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.51–3.46 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.45–3.38 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.31–3.27 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.26–3.13 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.10 (d,  $J$  = 14.2 Hz, 1H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 2.97–2.88 (m,

2H, -CH<sub>2</sub>O); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 30.9, 38.6, 40.0, 42.0, 51.6, 66.7, 68.3, 69.2, 69.6 (CH<sub>2</sub>); 115.0, 121.6, 124.7, 125.5, 126.7 (2C), 126.8, 127.1, 128.3 (2C), 129.6 (CH); 114.6, 116.5, 124.8, 128.1, 132.2, 132.8, 136.2, 138.7, 140.8, 151.0, 168.6, 170.0 (C); C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> (719.46); HRMS (ESI): *m/z* (C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>BrClN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>, Monokation) ber. 684.14038, gef. 684.14105; HPLC (isokratisch): 96.5% bei 254 nm, 97.5% bei 280 nm, *t*<sub>M+S</sub> = 3.87 min, *t*<sub>M</sub> (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 40:60); λ<sub>max</sub>: 233 nm, 308 nm, 372 nm.

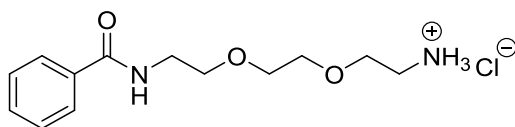
*tert*-Butyl-{2-[2-(2-benzamidoethoxy)ethoxy]ethyl}carbamate (**77**)



Es wurde unter Stickstoff gearbeitet. Zu einer Lösung aus *tert*-Butyl-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}carbamate (**67**, 124 mg, 499 μmol) und Triethylamin (70 μL, 0.51 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (10 mL) wurde eine Lösung aus Benzoylchlorid (**76**, 58 μL, 0.50 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (5 mL) hinzugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 2 h gerührt und anschließend mit 0.1 M HCl (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingedunstet. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (150 mg, 85%).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8.51 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, -NH), 7.88–7.80 (m, 2H, ArH), 7.55–7.49 (m, 1H, ArH), 7.48–7.41 (m, 2H, ArH), 6.76 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH-Boc), 3.55–3.51 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>O), 3.51–3.48 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>O), 3.41 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>O), 3.37 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>O), 3.05 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>O), 1.36 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 28.2 (3C) (CH<sub>3</sub>); 39.2, 39.7, 68.9, 69.2, 69.5, 69.6 (CH<sub>2</sub>); 127.2 (2C), 128.3 (2C), 131.1 (CH); 77.6, 134.4, 155.6, 166.2 (C); C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (352.43).

Die Verbindung ist bereits literaturbekannt.<sup>159</sup>

*N*-{2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethyl}benzamid Hydrochlorid (**78**)

Es wurde nach der AAV4 gearbeitet. Die Verbindung wurde synthetisiert aus *tert*-Butyl-{2-[2-(2-benzamidoethoxy)ethoxy]ethyl}carbamate (**77**, 145 mg, 411  $\mu$ mol), getrocknetem Dichlormethan (30 mL), Propan-2-ol (5 mL), Trifluoressigsäure (7 mL), 6 Tropfen propan-2-olischer HCl und Diethylether (40 mL). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Lagerung bei 2 °C über Nacht wurde das Lösungsmittel abdekantiert und das Öl getrocknet. Es wurde ein farbloses Harz erhalten (110 mg, 93%).

IR (NaCl-Scheibe): 3279  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1637  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.60 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, -NH), 8.02 (s, 3H,  $-\text{NH}_3^+$ ), 7.92–7.83 (m, 2H, ArH), 7.56–7.50 (m, 1H, ArH), 7.50–7.43 (m, 2H, ArH), 3.67–3.50 (m, 8H,  $-\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.43 (q,  $J$  = 6.1 Hz, 2H,  $-\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.00–2.85 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{O}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 39.5, 40.1, 67.6, 69.9, 70.5, 70.7 ( $\text{CH}_2$ ); 128.2 (2C), 129.3 (2C), 132.2 (CH); 134.3, 166.3 (C);  $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_3$  (288.77); MS (EI):  $m/z$  (%): 105.0 [ $\text{M}^{+\bullet}-183.1$ ] (100); HRMS (ESI):  $m/z$  ( $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3$ , Monokation) ber. 253.15467, gef. 253.15479; HPLC (isokratisch): 99.6% bei 254 nm, 99.6% bei 280 nm,  $t_{\text{M+S}}$  = 3.35 min,  $t_{\text{M}}$  (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 10:90);  $\lambda_{\text{max}}$ : 241 nm, 329 nm, 317 nm.

Die freie Base ist bereits literaturbekannt.<sup>159, 173</sup>

## 10.4 Biologische und biochemische Untersuchungen

Die Untersuchungen zu den Verbindungen **35**, sowie **36d–k**, **36u**, **36w–y** und **37** wurden gemeinsam mit ANDREA MEDEIROS und DIEGO BENÍTEZ im Labor von MARCELO COMINI, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay, durchgeführt. Die dabei erzielten experimentellen Daten sind in den folgenden Tabellen aufgeführt. Weitere Experimente zur Bestimmung des EC<sub>50</sub>-Werts von **35f** an *T. brucei brucei*-Parasiten, zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte der Serie **35** an der *TcTryS*, zur Untersuchung der Zytotoxizität von **36u** und biologische und biochemische Testungen der Verbindungen **36l–t** und **36v** wurden vom Kooperationspartner nachträglich durchgeführt. Die Ergebnisse aus diesen Testungen wurden zur Verfügung gestellt.

### Proliferationsuntersuchungen mit *T. brucei brucei*-Trypomastigoten

Die inhibierende Wirkung der Testverbindungen auf die Proliferation von Trypanosomen wurde an der infektiösen Blutform von *T. brucei brucei* vom Wildtyp 427 und *T. brucei brucei* Stamm 427, Zelllinie 449 GFP (FLORENCIA SARDI und MARCELO COMINI, unpubliziert) getestet. Die Zelllinie 449 GFP verfügt extrachromosomal über eine Kopie des Gens Grx1-roGFP2 und ist damit zur Expression des Grünen Fluoreszenzproteins (GFP) befähigt. Die Kultur der Parasiten erfolgte in 6 mL angereichertem HMI-9-Medium<sup>174</sup> in Cell Culture Flasks (Cellstar®, Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% in einem Inkubator (Forma Series 2 Water Jack, CO<sub>2</sub> Incubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Zur Kultur wurde das Medium für *T. brucei brucei* vom Wildtyp 427 mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum, 10 U/mL Penicillin (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 10 µg/mL Streptomycin (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.2 µg/mL Phleomycin (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und 5 µg/mL Hygromycin (Invitrogen) versetzt. Für die Kultur von *T. brucei brucei* der Zelllinie 449 GFP wurde auf die Verwendung von Penicillin und Streptomycin verzichtet.

In einem ersten Screening (5 µM Testkonzentration) wurden besonders aktive Verbindungen identifiziert und von Substanzen, die mehr als 50% Wachstumsinhibition zeigten, wurde der EC<sub>50</sub>-Wert determiniert.

Die Trypanosomen wurden bis zur *mid-log*-Phase (~2x10<sup>6</sup> Zellen/mL) kultiviert. Die Bestimmung der Parasitenkonzentration erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Kammer (Precicolor HBG, Giessen-Lützellinden, Deutschland). Anschließend wurden die Parasiten durch



Zentrifugieren bei 2000 x g für 10 min bei Raumtemperatur konzentriert und das Zellpellet mit frischem Medium zu einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/mL resuspendiert.

2 µL der DMSO-haltigen Testlösung wurde in jedes well einer 96-well-Mikrotiterplatte (costar® 3599, Corning, Tewksbury, MA, USA) gegeben. Nachdem 200 µL Zellsuspension zu jedem well hinzu pipettiert wurden, erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Nach 24 h wurden 50 µL (Versuche mit *Trypanosoma brucei brucei* der Zelllinie 449 GFP) oder 100 µL (Versuche mit *Trypanosoma brucei brucei* vom Wildtyp 427) eines wells in ein 1.1 mL Probengefäß (T100, Biotube™ System, Simport, Beloeil, QC, Kanada) gegeben und mit 150 µL oder 200 µL sterilem Phosphatsalzpuffer (pH 7), versetzt mit 1% (w/v) Glucose, verdünnt und homogenisiert. Anschließend wurde der Ansatz mit *T. brucei brucei*-Parasiten vom Wildtyp 427 an einem CyAN™ ADP-Durchflussszytometer (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) vermessen. Für Parasiten der Zelllinie 449 GFP wurde ein BD Accuri™ C6-Durchflussszytometer (BD Biosciences San Jose, CA, USA) verwendet. In beiden Fällen wurde ein Festphasen-Laser (488 nm) als Lichtquelle eingesetzt. In Experimenten, die mit Parasiten der Zelllinie 449 GFP durchgeführt wurden, wurde die Fluoreszenz des Propidiumiodids bei 585 nm detektiert. Dazu wurde die Probe direkt vor der Messung mit 2 µL Propidiumiodid (200 mg/mL) versetzt. Für beide Zelllinien wurden sowohl positive Ergebnisse (lebende Zellen) als auch negative Ergebnisse (tote Zellen) mit Hilfe des *forward scatter* (FSC, FS) und *side scatter* (SSC, SS) erfasst. Die Signale wurden logarithmisch mit Hilfe eines Verstärkers detektiert. Alle Messungen wurden bei einem konstanten Flux und einer konstanten Aufnahmezeit (60 Sekunden je Probe) durchgeführt. Die Daten wurden für *T. brucei brucei* vom Wildtyp 427 mit Hilfe der Software Summit (Dako) und Flow-Jo (FLOWJO) ausgewertet. Bei Experimenten mit der Zelllinie 449 GFP fand die Software BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) Verwendung. Als Kontrolle wurde Nifurtimox (Lampit® von Bayer, Leverkusen, Deutschland) in einer Konzentration von 15 µM (EC<sub>50</sub>-Wert) verwendet. Als Proliferationskontrolle wurde DMSO (1%) eingesetzt. Alle Verbindungen wurden dreifach angesetzt. Der relative prozentuale Anteil an lebenden Parasiten wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{lebende Parasiten [\%]} = \frac{\text{Anzahl an Parasiten für Verbindung X bei der Konzentration Y}}{\text{Anzahl an Parasiten in der Proliferationskontrolle}} \times 100$$

Die EC<sub>50</sub>-Werte wurden aus Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt, welche an eine sigmoidale Boltzmann-Gleichung angepasst wurden oder sie wurden durch Extrapolation aus nicht-linearen Ausgleichkurven bestimmt. Der Fehler wurde ausgedrückt als zweifache Standardabweichung (2 S.D.).

Tabelle 10-1: Proliferation von *T. brucei brucei* vom Wildtyp 427 im initialen Screening bei 5  $\mu$ M Inhibitorkonzentration.

Verb.	Konz. [ $\mu$ M]	Proliferation $\pm$ 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
35a	5	39.9 $\pm$ 2.4	3
35b	5	53.2 $\pm$ 8.9	2
35c	5	44.3 $\pm$ 6.1	3
35d	5	38.3 $\pm$ 4.5	3
35e	5	58.0 $\pm$ 15.0	2
35f	5	1.0 $\pm$ 1.7	2
35g	5	31.4 $\pm$ 8.3	3
35h	5	33.1 $\pm$ 2.8	3
35i	5	49.1 $\pm$ 1.4	2
35j	5	59.4 $\pm$ 4.8	3
35k	5	33.8 $\pm$ 4.5	3

Tabelle 10-2: Proliferation von *T. brucei brucei* vom Wildtyp 427 bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

Verb.	Konz. [ $\mu$ M]	Proliferation $\pm$ 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
35a	100	2.4	1
35a	50	0.2 $\pm$ 0.1	2
35a	10	2.5 $\pm$ 0.3	2
35a	1	43.4 $\pm$ 4.4	3
35a	0.5	63.6 $\pm$ 5.8	3
35a	0.05	92.8 $\pm$ 2.0	3
35a	0.005	107.4 $\pm$ 6.6	2
35c	100	0	3
35c	50	0	3
35c	10	3.0 $\pm$ 4.0	3
35c	1	33.4 $\pm$ 2.3	2
35c	0.5	46.1 $\pm$ 2.5	2
35c	0.05	93.7 $\pm$ 7.1	2
35c	0.005	101.9 $\pm$ 12.8	3
35d	100	0	3
35d	50	0.4	1
35d	10	14.9 $\pm$ 9.8	2
35d	1	44.3 $\pm$ 10.7	2
35d	0.5	71.0 $\pm$ 12.5	2
35d	0.05	92.2 $\pm$ 30.4	2
35d	0.005	132.2 $\pm$ 24.1	2
35e	100	0	3
35e	50	0	3
35e	10	0.5 $\pm$ 0.6	2
35e	1	37.9 $\pm$ 2.9	2
35e	0.5	38.9 $\pm$ 4.1	2
35e	0.05	85.9 $\pm$ 14.6	2
35e	0.005	95.0 $\pm$ 15.7	3
35g	100	2.0 $\pm$ 3.6	2
35g	50	20.8 $\pm$ 5.8	2
35g	10	25.5 $\pm$ 0.5	3
35g	1	44.3 $\pm$ 2.7	3
35g	0.5	65.4 $\pm$ 4.4	3

Fortsetzung: Tabelle 10-2: Proliferation von *T. brucei brucei* vom Wildtyp 427 bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

Verb.	Konz. [ $\mu$ M]	Proliferation $\pm$ 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
35g	0.05	94.3 $\pm$ 7.2	2
35g	0.005	102.6 $\pm$ 19.5	3
35h	100	0.2 $\pm$ 0.2	3
35h	50	0.2 $\pm$ 0.0	2
35h	10	27.1 $\pm$ 0.8	3
35h	1	58.6 $\pm$ 6.1	2
35h	0.5	73.1 $\pm$ 10.3	3
35h	0.05	100.6 $\pm$ 22.0	2
35h	0.005	111.2 $\pm$ 8.7	2

Tabelle 10-3: EC<sub>50</sub>-Werte aktiver Verbindungen an *T. brucei brucei* vom Wildtyp 427.

Verb.	EC <sub>50</sub> $\pm$ 2 S.D. [ $\mu$ M]
35a	0.8 $\pm$ 0.4
35c	1.1 $\pm$ 0.4
35d	0.84 $\pm$ 0.4
35e	0.3 $\pm$ 0.2
35f	1 $\pm$ 0.6
35g	0.84 $\pm$ 0.4
35h	1.8 $\pm$ 0.6

Tabelle 10-4: Proliferation von *T. brucei brucei* der Zelllinie 449 GFP im initialen Screening bei 5  $\mu$ M Inhibitorkonzentration.

Verb.	Konz. [ $\mu$ M]	Proliferation $\pm$ 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
36d	5	7.2 $\pm$ 1.9	2
36e	5	3.2 $\pm$ 1.2	2
36g	5	13.2 $\pm$ 2.7	3
36h	5	27.3 $\pm$ 5.7	3
36i	5	2.8 $\pm$ 0.5	3
36j	5	75.3 $\pm$ 20.5	3
36k	5	91.8 $\pm$ 13.0	2
36q	5	87 $\pm$ 4	3
36s	5	100 $\pm$ 4	3
36t	5	91 $\pm$ 4	3
36u	5	54.2 $\pm$ 6.2	2
36w	5	42.2 $\pm$ 8.5	3
36x	5	82.6 $\pm$ 10.2	3
36y	5	0.7 $\pm$ 0.2	3
37a	5	87.8 $\pm$ 6.5	3
37b	5	3.7 $\pm$ 0.4	3
37c	5	14.4 $\pm$ 4.5	2
37d	5	25.9 $\pm$ 2.0	2

Tabelle 10-5: Proliferation von *T. brucei brucei* der Zelllinie 449 GFP bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

Verb.	Konz. [μM]	Proliferation ± 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
36d	25	13.7 ± 1.0	3
36d	5	7.2 ± 1.9	2
36d	2.5	40.0 ± 3.9	3
36d	1.25	55.7 ± 5.9	3
36d	0.625	62.7 ± 8.6	3
36d	0.1	92.9 ± 12.4	3
36d	0.001	110.9 ± 5.9	3
36e	5	3.2 ± 1.2	3
36e	2.5	16.2 ± 0.7	2
36e	1.25	51.2 ± 10.8	3
36e	0.625	69.2 ± 7.5	3
36e	0.1	78.8 ± 9.1	2
36e	0.001	102.2 ± 0.9	2
36g	25	7.5 ± 1.5	3
36g	5	13.2 ± 2.7	2
36g	2.5	57.3 ± 3.6	3
36g	1.25	74.1 ± 0.7	3
36g	0.625	84.9 ± 15.6	3
36g	0.1	109.8 ± 26.9	2
36h	25	8.5 ± 5.2	2
36h	5	27.3 ± 5.7	3
36h	2.5	82.4 ± 4.0	3
36h	1.25	90.9 ± 3.3	3
36h	0.625	94.6 ± 5.1	3
36h	0.001	100.1 ± 0.2	2
36i	5	2.8 ± 0.5	3
36i	2.5	7.1 ± 0.1	3
36i	1.25	37.0 ± 4.8	2
36i	0.625	75.8 ± 22.7	3
36i	0.1	104.1 ± 7.2	2
36w	5	42.2 ± 8.5	3
36w	2.5	60.5 ± 2.9	3
36y	5	0.7 ± 0.2	3
36y	2.5	2.4 ± 0.1	2
36y	1.25	27.1 ± 4.9	3
36y	1	86.8 ± 3.9	3
36y	0.625	61.6 ± 9.9	2
36y	0.1	70.0 ± 14.3	2
36y	0.01	88.8 ± 8.1	2
36y	0.001	100.7 ± 6.1	3
37b	5	3.7 ± 0.4	2
37b	2.5	34.4 ± 3.0	3
37b	1.25	58.9 ± 12.0	3
37b	0.625	65.7 ± 1.6	3
37b	0.1	63.5 ± 6.3	3
37b	0.001	90.0 ± 1.7	3
37b	0.0001	103.8 ± 2.7	2
37c	25	0.6 ± 0.1	3
37c	5	14.4 ± 4.5	3
37c	2.5	68.4 ± 2.4	2
37c	1.25	76.8 ± 5.3	3

Fortsetzung: Tabelle 10-5: Proliferation von *T. brucei brucei* der Zelllinie 449 GFP bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

Verb.	Konz. [μM]	Proliferation ± 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
37c	0.625	78.5 ± 10.0	3
37c	0.1	91.9 ± 6.5	3
37c	0.001	94.9 ± 3.3	3
37d	25	0.5 ± 0.2	2
37d	5	25.9 ± 2.0	2
37d	2.5	90.4 ± 4.6	2
37d	1.25	98.3 ± 5.2	3
37d	0.625	104.2 ± 7.3	2
37d	0.01	106.5 ± 1.9	3

Tabelle 10-6: EC<sub>50</sub>-Werte aktiver Verbindungen an *T. brucei brucei* der Zelllinie 449 GFP.

Verb.	EC <sub>50</sub> ± 2 S.D. [μM]
36e	1.1 ± 0.4
36d	1.3 ± 0.6
36g	2.4 ± 0.8
36h	3.8 ± 0.6
36i	1.0 ± 0.2
36u	5
36l	1–5
36m	1–5
36n	1–5
36p	2.5–5
36w	4
36y	0.2 ± 0.2
37b	1.3 ± 0.4
37c	2.0 ± 0.3
37d	4.0 ± 0.2

#### Proliferationsuntersuchungen mit *L. infantum*-Promastigoten

Promastigoten des Erregers *Leishmania infantum* (Stamm: MHOM MA67ITMAP263, zur Verfügung gestellt von Dr. Helena Castro und Dr. Ana Tomás, IBMC, Portugal) wurden bei 28 °C in angereichertem RPMI 1640 Glutamax-Medium in Cell Cultur Flasks (Cellstar® Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) in einem Inkubator (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) kultiviert. Das Medium wurde mit 10% (v/v) inaktiviertem fetalem Kälberserum (iFBS), 50 U/mL Penicillin (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 50 mg/mL Streptomycin (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und 25 mM HEPES Natriumsalz Puffer (pH 7.4) versetzt. Durch tägliches Suspendieren zu 5x10<sup>5</sup> Parasiten/mL wurden die Parasiten synchronisiert und die Kultur in der Phase des

exponentiellen Wachstums gehalten. 2 µL der DMSO-haltigen Substanzlösung wurde in jedes *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte (costar® 3599, Corning, Tewksbury, MA, USA) gegeben. Als Proliferationskontrolle wurde DMSO (1%) verwendet. Als weitere Kontrolle wurde Kaliumantimonyltartrat in seiner EC<sub>50</sub>-Konzentration (30 µg/mL) eingesetzt. Anschließend wurden 200 µL Zellsuspension mit 5x10<sup>5</sup> Parasiten/mL in jedes *well* ausgesät. Für jede Verbindung wurden zwei *well*-Einheiten präpariert. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C für 24 h. Anschließend wurde die Anzahl lebender Parasiten mit Hilfe der Neubauer-Kammer (Precicolor HBG, Giessen-Lützellinden, Deutschland) bestimmt. Um die Parasiten für die Zählung zu fixieren, wurden sie mit sterilem Phosphatsalzpuffer (pH 7), versetzt mit 4% (w/v) Paraformaldehydlösung, verdünnt. Es erfolgte eine Doppelbestimmung je *well*. Der relative prozentuale Anteil an lebenden Parasiten wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{lebende Parasiten [\%]} = \frac{\text{Anzahl an Parasiten für Verbindung X bei der Konzentration Y}}{\text{Anzahl an Parasiten in der Proliferationskontrolle}} \times 100$$

Der Fehler wurde ausgedrückt als 2 S.D.

Tabelle 10-7: Proliferation von *L. infantum*-Promastigoten bei 5 µM Inhibitorkonzentration.

Verb.	Konz. [µM]	Proliferation ± 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
<b>36d</b>	5	85.0 ± 35.7	2
<b>36g</b>	5	87.2 ± 55.1	2
<b>36h</b>	5	67.0 ± 15.1	2
<b>36i</b>	5	53.1 ± 31.5	2
<b>36j</b>	5	68.1 ± 7.3	2
<b>36k</b>	5	76.2 ± 1.2	2
<b>36u</b>	5	67.0 ± 15.1	2
<b>36y</b>	5	86.1 ± 30.3	2

### Expression, Reinigung und Inhibition der Trypanothionsynthetase

Die TryS von unterschiedlichen Trypanosomatiden wurden in rekombinanter Form mit einem *N*-terminalen His-*tag* exprimiert. Das Konstrukt pET-15b *TbTryS*<sup>175</sup> (freundlicherweise überlassen von Dr. Alan Fairlamb, Dundee University, Dundee, Schottland), pRSET-A *TcTryS* (freundlicherweise überlassen von Dr. Sergio Guerrero, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentinien) und pET-28c(+) *LtTryS* (zur Verfügung gestellt von Dr. Ana Tomás, Institute for Molecular and Cell Biology, Porto, Portugal) wurden benutzt, um die TryS von *T. brucei brucei* 427 (MITat1.4) (GenBank™ Identifikation CAC87573.1), *T. cruzi*

*strain* Tulahuen 0 (GenBank™ Identifikation AAO00722.1) und *L. infantum* JPCM5 (GenBank™ Identifikation CAM69145.1<sup>176</sup>) zu biosynthetisieren. *E. coli strain* BL21 (DE3) dienten als Wirtszellen zur Expression von *TbTryS*, *LtTryS* und *TcTryS*. Für die Starterkulturen jedes einzelnen Expressionssystems wurden frische transformierte Zellen verwendet, die in LB-Medium suspendiert wurden, welches das entsprechende selektive Antibiotikum enthielt (100 µg/mL Ampicillin für pET-15b *TbTryS* und pRSET-A *TcTryS*, 50 µg/mL Kanamycin für pET-28c(+) *LtTryS*). Die Kulturen wuchsen bei 37 °C und 180 rpm über Nacht.

Im Fall der *TbTryS* wurden 5 mL der Starterkultur verwendet, um 500 mL *Terrific Broth* Medium in einem 2 L Erlenmeyerkolben anzupflegen. Das Brutmedium wurde vorher mit 10 g/L Glucose und 100 µg/mL Ampicillin versetzt. Die Kolben wurden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, bis bei 600 nm eine optische Dichte von 0.8–1.0 erreicht wurde. Anschließend wurden sie für 15 min bei 4 °C gelagert. 0.5 mM Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (IPTG) wurden hinzugegeben, um die Expression des rekombinanten Proteins zu induzieren. Die Kultur erfolgte bei 25 °C und 180 rpm für weitere 5 h.

Für die Expression von *TcTryS* und *LtTryS* wurden 5 mL der Starterkultur benutzt, um 500 mL ZYM-5052 *auto-induction*-Medium anzupflegen, welches mit 10 µg/L Ampicillin und 50 µg/mL Kanamycin angereichert wurde. Die Kolben wurden bei 37 °C und 180 rpm für 5 h und dann bei 25 °C und 120 rpm für weitere 16–18 h inkubiert.

Durch Zentrifugieren (4000 x g, 15 min, 4 °C, Zentrifuge Sorvall RC-6, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde ein Pellet erzeugt und dieses anschließend in einem Puffer (Puffer A: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 7.2 unter Zusatz von 10 mM Imidazol) resuspendiert. Je Gramm Pellet wurden 5 mL Puffer verwendet. Die Lyse der Zelle wurde durch Zusatz von 30 mg % (w/v) Lysozym eingeleitet, gefolgt von Schütteln für 1 h bei 4 °C und Ultraschall unter Eiskühlung (4 Impulse innerhalb von 30 Sekunden gefolgt von 60 Sekunden Pause) mit einer Amplitude von 40%. Hierfür wurde der *Digital Sonifier* (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) verwendet. 30 Minuten nach Beginn der Lyse der Zelle wurden 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 4 U/mL DNase hinzugefügt. Das Lysat wurde bei 30000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Aufreinigung gefiltert (0.45 µm Filter) und anschließend auf eine 1 mL *His Trap Fast Flow*-Säule (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) geladen. Die Säule wurde zuvor mit Puffer A äquilibriert. Nach der Beladung wurde die Säule mit Puffer A unter Zusatz von 25 mM Imidazol gewaschen und anschließend wurde das rekombinante Protein mit 10 mL Puffer B (Puffer A unter Zusatz von 500 mM Imidazol) von der Säule gespült und unterschiedliche Fraktionen aufgefangen. Die Chromatographie wurde bei 4 °C und einer Durchflussrate von 1 mL/min unter Verwendung

einer peristaltischen Pumpe (TRIS Teledyne ISCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Fraktionen, die aktives Protein enthielten, wurden vereinigt.

Zur Bestimmung von Fraktionen mit aktivem Enzym wurde ein PK/LDH-Assay durchgeführt. Die Untersuchung wurde bei Raumtemperatur in Puffer (100 mM HEPES-K, 0.5 mM EDTA, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.4) durchgeführt. Ammoniumsulfat-Suspensionen von PK und LDH wurden in Puffer zu 1000 U/mL verdünnt. Das Endvolumen in der verwendeten Quarzküvette betrug 150 µL Puffer mit 0.2 mM NADH, 1 mM PEP, 5 mM DTT, 10 U/mL PK und 10 U/mL LDH, 5 mM ATP und GSH (0.57, 0.33 oder 0.25 mM für die *TcTryS*, *TbTryS* und *LiTryS*). Die Reaktionsproben wurden für 3 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 18 mM Spermidin gestartet. Die Absorption wurde bei 340 nm mit einem Photometer (Varian Cary 50 Bio UV-Visible Spectrometer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) verfolgt.

Der letzte Aufreinigungsschritt bestand aus einer Größenausschlusschromatographie (SEC) bei Raumtemperatur. Es wurde eine Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL-Säule (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) äquilibriert mit Reaktionspuffer (siehe Aktivitätsassay) unter Zusatz von 150 mM NaCl und einer Durchflussrate von 0.75 mL/min verwendet. Alle Enzyme eluierten mit einem Retentionsvolumen vergleichbar mit einer monomeren Proteinspezies von 74–78 kDa. Die eluierten Fraktionen, die die rekombinante TryS enthielten, wurden unter Verwendung eines 30 kDa cut-off Amicon Filters (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) aufkonzentriert und bei –20 °C in Reaktionspuffer mit 150 mM NaCl unter Zusatz von 40% (v/v) Glycerol gelagert. Unter diesen Bedingungen konnte das Enzym für mehr als sechs Monate ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

Nach beiden Chromatographien wurde eine SDS-PAGE (12% Gel) unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, um die Reinheit des Enzyms zu überprüfen. Weiterhin wurde nach dem finalen Aufreinigungsschritt der TryS-Aktivitätsassay (siehe unten) durchgeführt, um die Aktivität des Enzyms zu überprüfen.

Ein finaler *Bicinchoninic Acid*-Assay (BCA) unter Verwendung von Kälberserumalbumin als Standard diente dazu, die Proteinkonzentration zu ermitteln. Hierfür wurde 8 mL Reagenz A (*Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit*, Sigma-Aldrich; Bicinchoninsäure-Lösung unter Zusatz von Natriumcarbonat, Natriumtartrat, Natriumbicarbonat, pH 11.25) mit 160 µL Reagenz B (*Bicinchonin Acid Protein Assay Kit*, Sigma-Aldrich; 4% (m/v) Kupfer(II)sulfat Pentahydrat-Lösung) gemischt. Für die Erstellung der Kalibriergerade wurden verschiedene Konzentrationen von Rinderserumalbumin (2.5–0.019 mg/mL) durch Verdünnung mit Wasser hergestellt. Es wurde vierfach angesetzt. Die Reaktion wurde gestartet, indem in einer 96-well-Mikrotiterplatte 200 µL der Reagenz-Mischung mit 10 µL der Proteinprobe mit



unbekanntem Gehalt (Verdünnung mit Reaktionspuffer (siehe TryS-Aktivitätsassay) 1:5 und 1:10) oder 10 µL Proteinstandard durch vorsichtiges Schütteln homogenisiert wurden. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 min. Als Blindproben wurden *well*-Einheiten sowohl mit 10 µL Wasser statt Kälberserumalbuminlösung, als auch 10 µL Reaktionspuffer statt der unbekannten Proteinprobe mit der Reagenzmischung homogenisiert und inkubiert. Die Absorption wurde bei 570 nm mit einem *MultiScan EX plate reader* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ermittelt und anschließend um die Absorptionen der jeweiligen Blindproben korrigiert. Es wurde eine Kalibriergerade (Absorption bei 570 nm gegen mg/mL Proteinstandard) erstellt, anhand der die Konzentrationsbestimmung der unbekannten Probe erfolgte.

Es wurde eine Ausbeute von 4–8 mg rekombinantes Protein je Liter Kulturmedium mit einer Reinheit von ≥95% und einer homogenen spezifischen Aktivität erhalten.

Die TryS-Aktivität wurde unter Verwendung des Malachitgrün-Reagenzes (BIOMOL GREEN™; Enzo® Life, Lausen, Schweiz) bestimmt, das die Quantifizierung des anorganischen Phosphates erlaubt. Das anorganische Phosphat wird bei der Biosynthese des Trypanothions aus ATP freigesetzt.

Der Assay wurde bei Raumtemperatur unter Verwendung einer 96-*well*-Mikrotiterplatte mit einem Reaktionsvolumen von 50 µL je *well* durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 40 µL eines Mastermixes, welcher aus Reaktionspuffer (100 mM HEPES-K, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 5 mM DTT) unter Zusatz von 2 mM Spermidin, einer variierenden Konzentration an Glutathion (570 µM, 250 µM und 50 µM für die *TcTryS*, *LiTryS* und *TbTryS*) und 150 µM ATP bestand. Außerdem wurden 5 µL Testsubstanz gelöst in DMSO oder 5 µL DMSO als Kontrolle und 5 µL Enzymlösung (*TcTryS*: 92 nM, ~0.200 µmol/min·mg; *TbTryS*: 230 nM, ~0.070 µmol/min·mg; *LiTryS*: 160–270 nM, ~0.11–0.15 µmol/min·mg) verwendet. Die Konzentration an Spermidin wurde an die physiologischen intrazellulären Konzentrationen angepasst.<sup>177–179</sup> GSH wurde in Konzentrationen eingesetzt, die Substratinhibition vermieden oder es wurde ebenfalls an bekannte intrazelluläre Konzentrationen angepasst.<sup>48</sup> Die ATP-Konzentration wurde dabei so eingestellt, dass Assay-Interferenzen vermieden wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms (oder durch Zugabe von Reaktionspuffer im Falle der Blindproben) gestartet und nach 15 min durch Zugabe von 200 µL Malachitgrün-Reagenz beendet. Nach weiteren 20 min wurde die Absorption bei 650 nm photometrisch mit Hilfe des *MultiScan EX plate reader* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vermessen. Die TryS-Aktivität wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Aktivität [\%]} = \frac{(A_{650 \text{ nm X}} - A_{650 \text{ nm X Blindprobe}})}{(A_{650 \text{ nm Kontrolle}} - A_{650 \text{ nm Kontrolle Blindprobe}})} \times 100$$

mit A<sub>650 nm X</sub> als Absorption der Testverbindung X bei 650 nm, A<sub>650 nm X Blindprobe</sub> als Absorption der Blindprobe mit Testverbindung X bei 650 nm, A<sub>650 nm Kontrolle</sub> als Absorption der Reaktionskontrolle mit DMSO bei 650 nm und A<sub>650 nm Kontrolle Blindprobe</sub> als Absorption der Blindprobe der entsprechenden Reaktionskontrolle mit DMSO bei 650 nm. Der Assay wies eine intra-Assay-Koeffizientenvariation von ≤2.5%, einen Signal-Rausch-Koeffizienten von ~3.5 und einen Z'-Faktor von ≥0.85 auf.

Für aktive Verbindungen wurde auf Assay-Interferenzen des Inhibitors durch Verwendung von K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> als P<sub>i</sub>-Standard geprüft. Hierzu wurde in eine *well*-Einheit 40 µL Mastermix unter Zusatz von 25 µM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> angesetzt. Nach Zugabe von 5 µL Testverbindung gelöst in DMSO (unterschiedliche Konzentrationen z. B. 300 µM für das Screening) oder 5 µL DMSO als Referenz und anschließend 5 µL Reaktionspuffer (siehe Aktivitätsassay) unter Zusatz von 150 mM NaCl wurde der Ansatz durch Schütteln homogenisiert. Nach Zugabe von 200 µL Malachitgrün-Reagenz (BIOMOL GREEN™; Enzo® Life, Lausen, Schweiz) wurde die 96-*well*-Mikrotiterplatte für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 650 nm ermittelt. Der Interferenzfaktor (F) wurde wie folgt bestimmt:

$$F = 1 + \left( 1 - \frac{A_{650 \text{ nm X}}}{A_{650 \text{ nm DMSO}}} \right)$$

mit A<sub>650 nm X</sub> für die Absorption der Testverbindung X bei 650 nm und A<sub>650 nm DMSO</sub> für die Absorption der Referenz bei 650 nm. Ein F-Wert über oder unter 1 zeigt eine Interferenz an. In diesem Fall wurde der F-Wert benutzt, um die %-Aktivität der TryS zu korrigieren.

Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt, welche an sigmoidale Boltzmann-Gleichungen angepasst wurden oder sie wurden durch Extrapolation aus nicht-linearen Ausgleichskurven bestimmt. Als Positivkontrolle wurde DMSO (1%) verwendet, als Negativkontrolle wurden Verbindungen in der jeweiligen IC<sub>50</sub>-Konzentration (das Paullon MOL2008 bei *TbTryS* und *LTryS*, das Benzofuroxan-Derivat J18 bei *TcTryS*) eingesetzt. Alle Reaktionen wurden vierfach angesetzt und vermessen. Der Fehler wurde ausgedrückt als 2 S.D.

Tabelle 10-8: Aktivität der *L*TryS bei 30  $\mu$ M Inhibitorkonzentration.

Verb.	Konz. [ $\mu$ M]	Aktivität <i>L</i> TryS $\pm$ 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
35a	30	109.1 $\pm$ 8.3	4
35b	30	32.7 $\pm$ 2.3	4
35c	30	36.2 $\pm$ 7.0	4
35d	30	33.7 $\pm$ 3.0	4
35e	30	48.6 $\pm$ 8.2	4
35f	30	63.7 $\pm$ 17.3	4
35g	30	32.5 $\pm$ 7.8	4
35h	30	55.4 $\pm$ 3.7	3
35i	30	15.8 $\pm$ 4.6	4
35j	30	29.6 $\pm$ 4.3	4
35k	30	95.5 $\pm$ 3.8	4
36d	30	33.4 $\pm$ 11.8	4
36e	30	52.9 $\pm$ 3.4	3
36g	30	15.3 $\pm$ 1.8	3
36h	30	22.6 $\pm$ 3.2	4
36i	30	22.8 $\pm$ 4.3	3
36j	30	21.7 $\pm$ 13.0	3
36k	30	14.5 $\pm$ 0.9	3
36u	30	9.8 $\pm$ 4.6	4
36w	30	47.6 $\pm$ 4.6	4
36x	30	50.4 $\pm$ 5.0	2
36y	30	42.6 $\pm$ 2.3	3
37a	30	66.2 $\pm$ 4.5	3
37b	30	95.7 $\pm$ 4.5	3
37c	30	98.9 $\pm$ 6.0	3
37d	30	87.0 $\pm$ 3.0	4

Tabelle 10-9: Aktivität der *L*TryS bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen.

Verb.	Konz. [ $\mu$ M]	Aktivität <i>L</i> TryS $\pm$ 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
35b	30	34.1 $\pm$ 5.9	4
35b	15	71.2 $\pm$ 3.7	4
35b	7.5	89.3 $\pm$ 2.7	4
35b	2.5	95.3 $\pm$ 2.2	2
35b	0.83	95.2 $\pm$ 4.9	3
35c	30	24.2 $\pm$ 2.3	4
35c	15	54.6 $\pm$ 10.5	4
35c	7.5	82.6 $\pm$ 5.8	4
35c	2.5	94.9 $\pm$ 5.4	3
35c	0.83	99.6 $\pm$ 7.1	4
35e	30	48.6 $\pm$ 8.2	4
35e	15	67.1 $\pm$ 7.5	3
35e	7.5	96.0 $\pm$ 2.0	2
35e	2.5	92.7 $\pm$ 11.3	4
35e	0.83	101.2 $\pm$ 7.0	4
35f	30	36.8 $\pm$ 5.2	3
35f	15	68.4 $\pm$ 15.3	3
35f	7.5	76.8 $\pm$ 3.4	3
35f	2.5	104.2 $\pm$ 9.5	4
35f	0.83	89.4 $\pm$ 2.7	3

Fortsetzung: Tabelle 10-9: Aktivität der *L*TryS bei unterschiedlichen Inhibitor-konzentrationen.

Verb.	Konz. [ $\mu$ M]	Aktivität <i>L</i> TryS $\pm$ 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
35g	300	18.1 $\pm$ 2.3	4
35g	100	24.9 $\pm$ 5.3	4
35g	33.3	23.3 $\pm$ 2.8	4
35g	11.1	48.6 $\pm$ 3.8	3
35g	3.7	65.2 $\pm$ 6.2	4
35g	1.23	75.4 $\pm$ 1.7	4
35g	0.41	76.9 $\pm$ 6.2	4
35g	0.137	80.7 $\pm$ 2.2	4
35g	0.046	75.0 $\pm$ 5.2	3
35g	0.015	77.1 $\pm$ 2.1	4
35j	30	25.2 $\pm$ 4.0	4
35j	15	38.9 $\pm$ 2.6	3
35j	7.5	60.7 $\pm$ 3.4	3
35j	2.5	74.9 $\pm$ 6.8	4
35j	0.83	95.0 $\pm$ 11.9	4
36d	30	30.3 $\pm$ 3.4	4
36d	15	34.3 $\pm$ 3.7	4
36d	10	37.3 $\pm$ 5.2	4
36d	5	48.7 $\pm$ 3.0	4
36d	3.3	56.8 $\pm$ 4.2	4
36g	3	20.6 $\pm$ 1.8	4
36g	1.5	34.2 $\pm$ 8.7	4
36g	1	42.7 $\pm$ 3.0	4
36g	0.5	61.3 $\pm$ 8.4	4
36g	0.3	95.0 $\pm$ 11.9	4
36h	3	40.0 $\pm$ 2.0	4
36h	1.5	52.3 $\pm$ 12.0	3
36h	1	58.6 $\pm$ 10.8	4
36h	0.5	83.4 $\pm$ 14.6	4
36h	0.3	83.8 $\pm$ 8.2	4
36i	30	21.4 $\pm$ 1.1	3
36i	10	27.3 $\pm$ 0.6	3
36i	3	44.8 $\pm$ 3.6	4
36i	1	65.7 $\pm$ 8.6	3
36i	0.33	75.3 $\pm$ 3.2	4
36j	30	16.5 $\pm$ 1.2	3
36j	10	22.1 $\pm$ 2.1	3
36j	3	44.4 $\pm$ 0.0	4
36j	1	65.3 $\pm$ 3.4	3
36j	0.33	77.5 $\pm$ 3.4	3
36k	30	20.1 $\pm$ 1.5	4
36k	15	28.3 $\pm$ 2.4	4
36k	10	37.8 $\pm$ 6.8	4
36k	5	50.4 $\pm$ 3.0	4
36k	3.3	58.7 $\pm$ 10.6	4
36k	0.37	63.0 $\pm$ 1.8	3
36u	30	8.2 $\pm$ 1.0	4
36u	10	9.4 $\pm$ 1.4	4
36u	3.3	15.1 $\pm$ 2.4	4
36u	1.1	31.0 $\pm$ 4.6	4
36u	0.37	58.1 $\pm$ 3.2	4
36u	0.123	76.9 $\pm$ 4.6	4

Fortsetzung: Tabelle 10-9: Aktivität der *L*/TryS bei unterschiedlichen Inhibitor-konzentrationen.

Verb.	Konz. [ $\mu$ M]	Aktivität <i>L</i> /TryS $\pm$ 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
36u	0.041	83.4 $\pm$ 8.0	4
36u	0.0137	86.8 $\pm$ 2.4	4
36u	0.0046	93.5 $\pm$ 6.8	3
36u	0.00151	92.6 $\pm$ 6.5	3
36y	30	39.9 $\pm$ 6.3	4
36y	10	62.1 $\pm$ 4.5	4

Tabelle 10-10: IC<sub>50</sub>-Werte von *L*/TryS-Inhibitoren.

Verb.	IC <sub>50</sub> $\pm$ 2 S.D. [ $\mu$ M]
35b	23 $\pm$ 4
35c	17 $\pm$ 3
35d	19 $\pm$ 3
35f	24 $\pm$ 5
35g	10 $\pm$ 3
35i	1.2 $\pm$ 0.5
35j	11 $\pm$ 3
36d	5.1 $\pm$ 0.5
36e	~30
36g	0.75 $\pm$ 0.1
36h	1.5 $\pm$ 0.2
36i	2.3 $\pm$ 0.4
36j	2.3 $\pm$ 0.3
36k	5.2 $\pm$ 0.4
36l	0.46 $\pm$ 0.1
36m	0.79 $\pm$ 0.1
36n	1.12 $\pm$ 0.3
36o	~30
36p	0.63 $\pm$ 0.1
36q	3.3 $\pm$ 0.1
36r	~30
36s	0.39 $\pm$ 0.1
36t	0.51 $\pm$ 0.04
36u	0.5 $\pm$ 0.1
36v	12.5 $\pm$ 0.2
36w	~30
36x	~30
36y	20.1 $\pm$ 0.5

Tabelle 10-11: Aktivität der *TbTryS* bei 30  $\mu\text{M}$  Inhibitorkonzentration.

Verb.	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Aktivität <i>TbTryS</i> $\pm$ 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
35a	30	50.1 $\pm$ 7.9	3
35b	30	55.3 $\pm$ 8.2	4
35c	30	55.9 $\pm$ 6.9	4
35d	30	42.0 $\pm$ 4.2	4
35e	30	53.7 $\pm$ 3.6	4
35f	30	53.5 $\pm$ 3.0	3
35g	30	58.0 $\pm$ 7.2	4
35h	30	63.5 $\pm$ 7.2	3
35i	30	65.2 $\pm$ 3.7	4
35j	30	64.8 $\pm$ 4.5	2
35k	30	75.8 $\pm$ 4.5	3
36d	30	85.5 $\pm$ 5.5	4
36e	30	87.5 $\pm$ 5.0	3
36g	30	55.6 $\pm$ 3.6	3
36h	30	102.7 $\pm$ 2.7	2
36i	30	89.1 $\pm$ 6.8	4
36j	30	98.3 $\pm$ 5.8	3
36k	30	87.4 $\pm$ 7.0	4
36l	30	84.0 $\pm$ 5.6	4
36m	30	79.5 $\pm$ 3.2	4
36n	30	91.9 $\pm$ 6.2	4
36o	30	75.2 $\pm$ 3.6	4
36p	30	101.2 $\pm$ 7.5	4
36q	30	93.9 $\pm$ 4.9	3
36r	30	72.1 $\pm$ 4.6	4
36s	30	89.2 $\pm$ 2.2	4
36t	30	75.4 $\pm$ 3.8	4
36u	30	53.6 $\pm$ 5.5	3
36v	30	72.7 $\pm$ 3.9	4
36w	30	58.7 $\pm$ 5.6	3
36x	30	81.2 $\pm$ 3.3	3
36y	30	87.8 $\pm$ 6.5	4
37a	30	72.9 $\pm$ 3.5	3
37b	30	86.9 $\pm$ 1.8	4
37c	30	90.8 $\pm$ 9.1	4
37d	30	88.5 $\pm$ 3.7	4

Tabelle 10-12: Aktivität der *TcTryS* bei 30  $\mu\text{M}$  Inhibitorkonzentration.

Verb.	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Aktivität <i>TcTryS</i> $\pm$ 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
35a	30	29.3 $\pm$ 5.0	4
35b	30	26.4 $\pm$ 2.3	4
35c	30	27.1 $\pm$ 3.6	3
35d	30	23.8 $\pm$ 1.9	4
35e	30	21.0 $\pm$ 3.1	4
35f	30	27.9 $\pm$ 2.1	3
35g	30	18.3 $\pm$ 6.6	4
35h	30	21.7 $\pm$ 4.3	4
35i	30	58.1 $\pm$ 5.2	3
35j	30	22.1 $\pm$ 5.0	3

Fortsetzung: Tabelle 10-12: Aktivität der *TcTryS* bei 30  $\mu\text{M}$  Inhibitorkonzentration.

Verb.	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Aktivität <i>TcTryS</i> $\pm$ 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
35k	30	54.8 $\pm$ 9.9	4
36d	30	94.8 $\pm$ 1.2	4
36e	30	122.7 $\pm$ 6.1	4
36g	30	77.2 $\pm$ 2.3	4
36h	30	58.6 $\pm$ 8.3	3
36i	30	94.2 $\pm$ 3.3	4
36j	30	105.8 $\pm$ 9.1	3
36k	30	96.2 $\pm$ 2.9	4
36l	30	82.9 $\pm$ 1.1	4
36m	30	78.6 $\pm$ 0.01	3
36n	30	83.2 $\pm$ 5.7	4
36p	30	92.1 $\pm$ 8.4	4
36q	30	88.7 $\pm$ 5.1	4
36s	30	93.3 $\pm$ 8.8	3
36t	30	85.1 $\pm$ 6.5	4
36u	30	92.2 $\pm$ 2.6	4
36v	30	59.4 $\pm$ 3.7	4
36w	30	86.0 $\pm$ 2.2	4
36x	30	53.7 $\pm$ 1.8	3
36y	30	93.1 $\pm$ 3.9	3
37a	30	92.3 $\pm$ 3.7	3
37b	30	95.8 $\pm$ 9.1	3
37c	30	86.6 $\pm$ 4.8	2
37d	30	107.0 $\pm$ 10.4	2

Tabelle 10-13:  $\text{IC}_{50}$ -Werte von *TcTryS*-Inhibitoren.

Verb.	$\text{IC}_{50} \pm 2 \text{ S.D. } [\mu\text{M}]$
35a	11 $\pm$ 2
35b	11 $\pm$ 3
35c	11 $\pm$ 2
35d	9 $\pm$ 1
35e	9 $\pm$ 1
35f	11 $\pm$ 4
35g	9 $\pm$ 3
35h	9 $\pm$ 2
35j	9 $\pm$ 3
36o	20 $\pm$ 3
36r	25 $\pm$ 3

### Zytotoxizitätsbestimmung

Die Mausmakrophagen (Zelllinie J774) wurden bei 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit und 37 °C in DMEM-Medium unter Zusatz von 10% (v/v) fetalem Kälberserum, 10 U/mL Penicillin und 10 µg/mL Streptomycin in einem Inkubator (Forma Series 2 Water Jack, CO<sub>2</sub> Incubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kultiviert. Es wurden DMSO-Stammlösungen der Verbindungen hergestellt und es wurden für den Assay drei *well*-Einheiten je Testkonzentration angesetzt. Die toxischen Effekte der Verbindungen wurden mit Hilfe eines kolorimetrischen Assays unter Verwendung eines Tetrazoliumsalzes (WST-1 Reagenz) erfasst. Eine Makrophagen-Suspension wurde aus einer Kultur, die sich in der *mid-log*-Phase befand, gewonnen. Dazu wurden die Makrophagen durch Zugabe von Trypsin (Einwirkungszeit: 10 min, Raumtemperatur) und anschließendem Schaben vom Boden der Kulturflaschen gelöst. Nachdem die Suspension bei 300 x g für 5 min zentrifugiert wurde, wurde das feuchte Zellpellet in frischem Kulturmedium zu einer Dichte von 5x10<sup>4</sup> Zellen/mL resuspendiert. 250 µL der Zellsuspension wurden in jede Kavität einer *96-well flat bottom microculture*-Platte (corning® 96 well TC-treated microplate, Corning, Tewksbury, MA, USA) gegeben.

Nach 24stündiger Inkubation bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C wurde das Medium getauscht. Es wurden 200 µL frisches Medium ohne Zusatz (Kontrolle), 200 µL Medium unter Zusatz der Testverbindungen oder reinem DMSO (Wachstumskontrolle, in der höchsten verwendeten DMSO-Konzentration) eingesetzt. Verschiedene Konzentrationen der Verbindung wurden durch Verdünnen der DMSO-Stammlösung mit Medium erzeugt. Als Standard wurde Nifurtimox als 80 und 160 µM Lösung im Medium verwendet. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde zunächst lichtmikroskopisch auf Substanzpräzipitation geprüft. War dies nicht der Fall, wurde das Medium abpipettiert und die *well*-Einheiten zwei Mal mit frischem Kulturmedium gewaschen. Das Überleben der Makrophagen wurde mit Hilfe des WST-1 Reagenzes (Roche®, Basel, Schweiz) bewertet, welches als 1:10 Verdünnung mit Kulturmedium eingesetzt wurde. 110 µL des so verdünnten Reagenz wurde in jedes *well* gegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 3 h unter Lichtausschluss. Anschließend wurde die Absorption des Formazans, das von metabolisch aktiven Zellen aus dem WST-1 gebildet wurde, bei 450 nm (Referenzwellenlänge bei 630 nm) mit einem EL 800 *microplate reader* (Biotek, Winooski, VT, USA) vermessen. Als Blindproben wurden *well*-Einheiten verwendet, die zwar Zellproliferationsreagenz, aber keine Zellen enthielten. Die gemessenen Absorptionen bei 450 nm für die Testverbindungen X, die DMSO-Kontrolle und die Blindprobe wurden um die korrespondierenden Absorptionen bei 630 nm durch Subtraktion korrigiert, sodass  $A_{X\ 450\ nm}$  für die Testverbindung,  $A_{DMSO\ 450\ nm}$  für die DMSO-Kontrolle



und A Blindprobe 450 nm für die Blindprobe erhalten wurden. Die Zytotoxizität errechnet sich dann wie folgt:

$$A X \text{ korr.} = A X 450 \text{ nm} - A \text{ Blindprobe } 450 \text{ nm}$$

$$A \text{ DMSO korr.} = A \text{ DMSO } 450 \text{ nm} - A \text{ Blindprobe } 450 \text{ nm}$$

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = 100 - \frac{A X \text{ korr.}}{A \text{ DMSO korr.}} \times 100$$

Falls möglich wurden die  $IC_{50}$ -Werte aus Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt, welche an sigmoidale Boltzmann-Gleichungen angepasst wurden oder sie wurden durch Extrapolation aus nicht-linearen Ausgleichkurven bestimmt.

Der Fehler wurde ausgedrückt als 2 S.D.

Tabelle 10-14: Zytotoxizität ausgewählter Verbindungen bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Verb.	Konz. [μM]	Zytotoxizität ± 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
35a	200	79.0 ± 8.2	3
35a	100	80.8 ± 13.2	3
35a	50	35.0 ± 3.9	2
35a	10	19.7 ± 4.2	3
35a	1	14.8 ± 0.7	3
35a	0.001	15.9 ± 16.7	3
35c	100	51.7 ± 1.7	2
35c	25	13.1 ± 10.4	2
35c	10	15.3 ± 3.7	2
35c	1	11.1 ± 1.2	3
35c	0.1	10.3 ± 1.9	2
35c	0.001	3.5	1
35d	100	96.5 ± 1.8	3
35d	10	46.3 ± 1.9	3
35d	1	24.9 ± 1.4	3
35d	0.001	14.5 ± 10.5	2
35e	100	86.0 ± 4.0	2
35e	50	23.1 ± 27.7	3
35e	10	13.8 ± 4.1	3
35e	1	0.6 ± 2.2	2
35f	200	98.7 ± 2.1	3
35f	10	21.9 ± 14.8	3
35f	1	17.3	1
35f	0.1	15.0 ± 3.6	3
35g	200	52.2 ± 8.6	3
35g	100	38.0 ± 2.1	2
35g	10	23.9 ± 1.5	3
35g	0.001	17.0 ± 38.4	3
35h	200	96.2 ± 5.8	2

Fortsetzung: Tabelle 10-14: Zytotoxizität ausgewählter Verbindungen bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Verb.	Konz. [ $\mu$ M]	Zytotoxizität $\pm$ 2 S.D. [%]	Anzahl der Messungen
35h	100	93.4 $\pm$ 5.6	3
35h	33.3	34.9 $\pm$ 8.2	3
35h	10	24.2 $\pm$ 4.1	3
35h	0.001	13.7 $\pm$ 20.9	3
36e	100	94.0 $\pm$ 1.8	3
36e	10	20.0 $\pm$ 9.2	3
36g	100	92.9 $\pm$ 1.0	3
36g	10	-3.4 $\pm$ 1.5	3
36h	100	36.9 $\pm$ 33.8	3
36h	10	-4.8 $\pm$ 1.1	3
36i	100	47.6 $\pm$ 7.5	3
36i	10	0.6 $\pm$ 9.1	3
36p	100	24 $\pm$ 6	3
36s	100	0 $\pm$ 4	3
36t	100	21 $\pm$ 2	3
36u	100	24 $\pm$ 16	3
36w	100	43.2 $\pm$ 17.5	3
36w	10	12.8 $\pm$ 4.9	3
36y	100	93.9 $\pm$ 2.0	3
36y	10	7.5 $\pm$ 8.9	3
37b	100	83.3 $\pm$ 6.0	3
37b	10	4.2 $\pm$ 9.1	3
37c	100	94.6 $\pm$ 1.9	3
37c	10	0.4 $\pm$ 7.6	3
37d	100	50.5 $\pm$ 13.2	3
37d	10	24.6 $\pm$ 18.2	3

Tabelle 10-15: EC<sub>50</sub>-Werte verschiedener Verbindungen an murinen Makrophagen.

Verb.	EC <sub>50</sub> $\pm$ 2 S.D. [ $\mu$ M]
35a	50–100
35c	100
35d	10
35e	50–100
35f	10–200
35g	200
35h	33–100
36e	10–100
36g	10–100
36h	>100
36i	>100
36l	6 $\pm$ 2
36m	9 $\pm$ 2
36n	14 $\pm$ 0.2
36p	>100
36q	67 $\pm$ 2
36s	>100

Fortsetzung: Tabelle 10-15: EC<sub>50</sub>-Werte verschiedener Verbindungen an murinen Makrophagen.

Verb.	EC <sub>50</sub> ± 2 S.D. [µM]
36t	>100
36u	>100
36w	>100
36y	10–100
37b	10–100
37c	10–100
37d	100

## 10.5 Physikochemische Eigenschaften

### Untersuchungen und Vorhersagen mit dem Programmpaket SwissADME<sup>144</sup>

Mit SwissADME wurden verschiedene physikochemische Parameter der Verbindungen, die in biologischen Tests eingesetzt wurden, berechnet oder vorhergesagt. So wurde die Einhaltung der Lipinski *rule of five* (RO5) untersucht. Abweichend von SwissADME wurde dabei der in der Tabelle dargestellte gemittelte logP-Wert zur Bewertung herangezogen. Der gemittelte logP-Wert wurde aus fünf verschiedenen Vorhersagen berechnet (iLOGP<sup>138</sup>, XLOGP3 berechnet mit dem XLOGP Programm Version 3.2.2, WLOGP<sup>139</sup>, MLOGP<sup>140–142</sup> und SILICOS-IT berechnet mit dem FILTER-IT Programm Version 1.0.2<sup>143</sup>). Der dargestellte logS-Wert ist ebenfalls ein Mittelwert aus drei verschiedenen Vorhersagen (ESOL<sup>145</sup>, Ali<sup>146</sup> und SILICOS-IT berechnet mit dem FILTER-IT Programm Version 1.0.2<sup>143</sup>). Aus dem gemittelten logS-Wert wurde die theoretische Wasserlöslichkeit berechnet nach der Gleichung:

$$\text{Löslichkeit } [\mu\text{mol/L}] = 10^6 \times 10^{\log S}$$

Tabelle 10-16: Untersuchungen zu physikochemischen Eigenschaften mit SwissADME.

Verb.	RO5 <sup>a</sup>	logP <sup>b</sup>	logS <sup>c</sup>	vorhergesagte Löslichkeit [ $\mu\text{mol/L}$ ] <sup>d</sup>
35a	MW >500, logP >5	5.06	-8.08	0.01
35b	MW >500, logP >5	5.04	-8.08	0.01
35c	MW >500	4.97	-8.08	0.01
35d	MW >500, logP >5	5.47	-8.69	0.002
35e	MW >500	4.94	-7.83	0.01
35f	MW >500	4.57	-7.59	0.03
35g	MW >500	4.07	-7.25	0.06
35h	MW >500, logP >5	5.48	-8.34	0.005
35i	MW >500	3.84	-6.85	0.14
35j	MW >500	3.85	-6.85	0.14
35k	MW >500	3.68	-6.87	0.13
36d	entspricht	3.02	-5.31	4.90
36e	entspricht	3.54	-5.42	3.80
36g	entspricht	3.36	-5.70	2.00
36h	entspricht	3.66	-6.03	0.93
36i	entspricht	4.19	-6.55	0.28
36j	entspricht	2.95	-5.40	3.95
36k	MW >500	1.95	-4.67	21.38
36l	MW >500	4.08	-6.60	0.25
36m	MW >500	4.13	-6.66	0.22
36n	MW >500	3.25	-5.95	1.12
36o	MW >500	3.92	-6.83	0.15
36p <sup>e</sup>	MW >500	0.96	-5.88	1.32
36q	MW >500	3.27	-5.87	1.35
36r	MW >500	4.54	-7.52	0.03
36s <sup>e</sup>	entspricht	2.57	-6.04	0.91
36t	entspricht	3.62	-5.64	2.29
36u	entspricht	4.19	-6.32	0.48
36v	MW >500	3.41	-6.63	0.23
36w	MW >500	3.79	-6.47	0.34
36x	MW >500	3.63	-6.60	0.25
36y	entspricht	3.58	-6.46	0.35
37a	entspricht	4.12	-5.83	1.48
37b	entspricht	4.64	-6.11	0.78
37c	entspricht	3.95	-6.11	0.78
37d	MW >500	4.30	-6.58	0.26

a Einhaltung der Lipinski *rule of five*, ggf. unter Angabe des Verstoßes

b Gemittelter logP-Wert aus der iLOGP-, XLOGP3-, WLOGP-, MLOGP- und SILICOS-IT-Vorhersage

c Gemittelter logS-Wert aus der ESOL-, Ali- und SILICOS-IT-Vorhersage

d Theoretische Wasserlöslichkeit berechnet aus dem gemittelten logS-Wert

e berechnet für die protonierte Form ohne Gegenion

### Thermodynamische Löslichkeit

Für die Ermittlung der thermodynamischen Löslichkeit wurde eine modifizierte Methode nach WÖLFEL<sup>147</sup> angewandt.

Proben und Verdünnungen wurden zweifach vermessen. Kallibriergeraden wurden aus zwei unabhängigen Einwaagen der gleichen Substanz erstellt. Für die Probe wurde zunächst Testsubstanz (250 µg) in ein Whatman® Mini-UniPrep®-Vial genau eingewogen und mit natriumchloridhaltigem Phosphat-Puffer pH 7.4 (400 µL, modifiziert nach Ph. Eur. 8. Ausgabe, Nachtrag 8.3: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (299 mg), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (19 mg), NaCl (800 mg), H<sub>2</sub>O bidest. (ad 100 mL), 3 M HCl auf pH 7.4) versetzt. Die Vials wurden anschließend mit dem Vialstempel verschlossen, ohne dass dieser durchgedrückt wurde. Nach Umschließen mit Parafilm® wurde das Vial im Inkubationsschüttler IKA® KS 3000 ic control bei 25 °C und 400 rpm für 24 h und 48 h inkubiert. Anschließend wurde der Parafilm® entfernt, die Probe durch Durchdrücken des Vial-Stempels filtriert und die Probe mit dem isokratischen HPLC-Verfahren unter Verkürzung der Gesamtlaufzeit im Absorptionsmaximum der Substanz vermessen (gewählte Wellenlängen: **35e** 236 nm, **35g** 228 nm, **36j** 231 nm, **36k** 232 nm, **36p** 319 nm, **36s** 319 nm). Zur Erstellung der Kallibriergerade wurde Testsubstanz (250 µg) in Eppendorf®-Plastikvials genau eingewogen und durch Zugabe eines definierten Volumens DMSO eine Stammlösung bekannter Konzentration erstellt. Durch Verdünnungen mit Acetonitril wurden nun verschiedene Kallibrierlösungen (z. B. 500 µM, 50 µM, 20 µM, 5 µM) in Eppendorf®-Plastikvials hergestellt. Diese wurden in ein Whatman® Mini-UniPrep®-Vial überführt, filtriert und mit dem isokratischen HPLC-Verfahren ebenfalls unter Verkürzung der Gesamtlaufzeit im Absorptionsmaximum der Substanz vermessen. Das Einspritzvolumen (15 µL) wurde für die Probenbestimmung und die Kallibrierung gleich gewählt. Die AUC der verschiedenen Kallibrierlösungen wurde ermittelt und anschließend wurde die AUC gegen die Konzentration aufgetragen und so eine Kallibriergerade erzeugt. Über die AUC der Probe und der erstellten Kallibriergerade erfolgte die Konzentrationsbestimmung der in Puffer gelösten Testsubstanz.

Tabelle 10-17: Thermodynamische Löslichkeit bestimmt mit einer *shake flask*-Methode. Die Löslichkeiten der Testverbindungen liegen unter der Grenze der Quantifizierung.

Verb.	S <sub>0</sub> , therm., exp. [µmol/L]
<b>35e</b>	<0.48
<b>35g</b>	<4.8
<b>36j</b>	<5
<b>36k</b>	<5
<b>36p</b>	<5
<b>36s</b>	<5

### Kinetische Löslichkeit

Die Bestimmung der kinetischen Löslichkeit wurde nach einer modifizierten Methode von BEVAN *et al.*<sup>149</sup> durchgeführt. In Anlehnung an diese Methode wurde DMSO in einer konstanten Konzentration von 5% in einem Endvolumen von 200 µL eingesetzt.

Für das Experiment, das als Screenig gedacht war, wurden Einzelmessungen durchgeführt. Es wurde Testsubstanz (250 µg) in ein Eppendorf®-Plastikvial genau eingewogen und eine DMSO-Stammlösung erstellt. Durch Verdünnungen mit DMSO wurde aus der DMSO-Stammlösung eine Verdünnungsreihe erstellt mit absteigender Konzentration an Testsubstanz. In die *well*-Einheiten einer Greiner 96 F-Bottom-Mikrotiterplatte (Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) wurde natriumchloridhaltiger Phosphat-Puffer pH 7.4 (190 µL, Zusammensetzung des Puffers siehe thermodynamische Löslichkeit) vorgelegt. Zum Puffer in den *well*-Einheiten wurden die Verdünnungen der Testsubstanz (10 µL) hinzupipetiert. Zur Bestimmung des Blindwerts wurde DMSO (10 µL) verwendet. Die Mikrotiterplatte wurde direkt mit dem Nephelometer NEPHELOstar Plus (BMG LABTECH) in Verbindung mit der Software Omega 5.11 unter den folgenden Bedingungen vermessen: Endpunktmessung mit einem Messintervall von 1 sec, Laserintensität 80%, Strahlenbündelung 2.50 mm, Schütteln mit der Methode *double orbital* mit 500 rpm für 5 sec direkt vor der Messung. Es wurde die *bottom optic*-Methode gewählt mit einer Absetzzeit von 0.8 sec. Die Proben wurden bei 25 °C vermessen. Zur Auswertung wurde die Software MARS 3.20 hinzugezogen. Die Messwerte, gemessen in RNU (*relative nephelometric unit*) wurden um den Blindwert korrigiert. Die Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers BMG LABTECH.<sup>150</sup> Zur Ermittlung der kinetischen Löslichkeit wurden zwei Ausgleichsgeraden erstellt, bei denen das Streulicht in RNU gegen die Substanzkonzentration aufgetragen wurde. Die erste Ausgleichsgerade umfasst niedrige Testkonzentrationen, bei denen es zu keiner Präzipitation der Verbindung kam. Die zweite Ausgleichsgerade umfasst höhere Substanzkonzentrationen, bei denen es zu einer Präzipitation der Testsubstanz kam, wobei sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Testkonzentration und der gemessenen Lichtstreuung zeigte. Die Verdünnungsreihe wurde so gewählt, dass mindestens drei Messkonzentrationen eine Gerade bilden. Vom Schnittpunkt der beiden Ausgleichsgeraden wurde das Lot auf die Konzentrations-Achse gefällt und damit die kinetische Löslichkeit definiert.

Tabelle 10-18: Kinetische Löslichkeit bestimmt mit einer nephelometrischen Methode.

Verb.	S <sub>0, kin., exp.</sub> [µmol/L]
36k	392
36p	124

## 11. Literatur

1. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases; World Health Organization: Genf **2010**, 2, 5.
2. United Nations. General assembly. Resolutions adopted by the general assembly: 55/2. United Nations Millennium Declaration; United Nations: New York **2000**.
3. Hotez, P. J.; Molyneux, D. H.; Fenwick, A.; Kumaresan, J.; Ehrlich Sachs, S.; Sachs, J. D.; Savioli, L.: Control of neglected tropical diseases. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 357, 1018–1027.
4. Feasey, N.; Wansbrough-Jones, M.; Mabey, David C. W.; Solomon, A. W.: Neglected tropical diseases. *Br. Med. Bull.* **2010**, 93, 179–200.
5. Hotez, P. J.; Molyneux, D. H.; Fenwick, A.; Ottesen, E.; Ehrlich Sachs, S.; Sachs, J. D.: Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS med.* **2006**, 3, e102.
6. DNDi: Drugs for neglected diseases initiative. <http://www.dndi.org/> (abgerufen am 12.01.2017).
7. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/) (abgerufen am 26.01.2017).
8. Mehlhorn, H.: Die Parasiten des Menschen: Erkrankungen erkennen, bekämpfen und vorbeugen; Springer Spektrum: Berlin, Heidelberg, 7. Auflage **2012**, 22–38.
9. Lopes, A. H.; Souto-Padron, T.; Dias, F. A.; Gomes, M. T.; Rodrigues, G. C.; Zimmermann, L. T.; Alves e Silva, T. L.; Vermelho, A. B.: Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. *Open Parasitol. J.* **2010**, 4, 30–59.
10. Hoare, C. A.; Wallace, F. G.: Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* **1966**, 212, 1385–1386.
11. WHO: Weekly epidemiological record. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **2015**, 90, 33–44.
12. WHO: Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases.: Third WHO report on neglected tropical diseases; World Health Organization: Genf **2015**, 78.
13. Rassi, A. , jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A.: Chagas disease. *Lancet* **2010**, 375, 1388–1402.
14. Barrett, M. P.; Croft, S. L.: Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Br. Med. Bull.* **2012**, 104, 175–196.
15. Stuart, K.; Brun, R.; Croft, S.; Fairlamb, A.; Gürtler, R. E.; McKerrow, J.; Reed, S.; Tarleton, R.: Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.* **2008**, 118, 1301–1310.
16. DNDi: About chagas disease. <http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/> (abgerufen am 13.01.2017).
17. Dias, J. C.; Silveira, A. C.; Schofield, C. J.: The impact of chagas disease control in Latin America - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, 97, 603–612.
18. Le Loup, G.; Pialoux, G.; Lescure, F. X.: Update in treatment of Chagas disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2011**, 24, 428–434.
19. Bermudez, J.; Davies, C.; Simonazzi, A.; Real, J. P.; Palma, S.: Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop.* **2016**, 156, 1–16.
20. DNDi: Paediatric dosage form of benznidazole (Chagas). <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/paediatric-benznidazole/> (abgerufen am 26.01.2017).
21. Chatelain, E.: Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J. Biomol. Screening* **2015**, 20, 22–35.

22. Molina, I.; Salvador, F.; Sánchez-Montalvá, A.: The use of posaconazole against Chagas disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2015**, *28*, 397–407.
23. DNDi: Fexinidazole (Chagas). <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/fexinidazole-chagas/> (abgerufen am 13.01.2017).
24. Stich, A.: Eine alte Bedrohung kehrt zurück: Die afrikanische Schlafkrankheit. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 546–550.
25. WHO: Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). <http://www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs259/en/> (abgerufen am 19.04.2017).
26. DNDi: About sleeping sickness. <http://www.dndi.org/diseases-projects/hat/#ftn1> (abgerufen am 13.01.2017).
27. Duszenko, M.: Afrikanische Trypanosomen: Die Erreger der Schlafkrankheit. *Biol. Unserer Zeit* **1998**, *28*, 72–81.
28. Control and surveillance of human African trypanosomiasis: Report of a WHO Expert Committee; World Health Organization: Genf, WHO technical report series No 984 **2013**, *1*, 82–102.
29. Kabayo, J. P.: Aiming to eliminate tsetse from Africa. *Trends Parasitol.* **2002**, *18*, 473–475.
30. Schlitzer, M.: Im letzten Jahrhundert entwickelt: Wirkstoffe zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 552–558.
31. Barrett, M. P.; Boykin, D. W.; Brun, R.; Tidwell, R. R.: Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 1155–1171.
32. Eperon, G.; Balasegaram, M.; Potet, J.; Mowbray, C.; Valverde, O.; Chappuis, F.: Treatment options for second-stage gambiense human African trypanosomiasis. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2014**, *12*, 1407–1417.
33. Grewala, A. S.; Panditab, D.; Bhardwaj, S.; Lathera, V.: Recent updates on development of drug molecules for human african trypanosomiasis. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 2245–2265.
34. WHO: Global health observatory (GHO) data. Leishmaniasis. Situation and trends. [http://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/) (abgerufen am 13.01.2017).
35. Burbach, G.; May, J.; Harms, G.; Bienzle, U.: Leishmaniosen: Grundlagen, Klinik, Diagnostik und Therapie. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1999**, *124*, 88–93.
36. Ryczak, J.; Kunick, C.: Antimon und mehr: Wirkstoffe zur Behandlung von Leishmaniosen. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 538–544.
37. Croft, S. L.; Olliaro, P.: Leishmaniasis chemotherapy - challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17*, 1478–1483.
38. Iqbal, H.; Ishfaq, M.; Wahab, A.; Abbas, M. N.; Ahmad, I.; Rehman, A.; Zakir, M.: Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2016**, *6*, 1–5.
39. Babokhov, P.; Sanyaolu, A. O.; Oyibo, W. A.; Fagbenro-Beyioku, A. F.; Iriemenam, N. C.: A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. *Pathog. Global Health* **2013**, *107*, 242–252.
40. Sundar, S.; Sinha, P. K.; Rai, M.; Verma, D. K.; Nawin, K.; Alam, S.; Chakravarty, J.; Vaillant, M.; Verma, N.; Pandey, K.; Kumari, P.; Lal, C. S.; Arora, R.; Sharma, B.; Ellis, S.; Strub-Wourgaft, N.; Balasegaram, M.; Olliaro, P.; Das, P.; Modabber, F.: Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* **2011**, *377*, 477–486.



41. DNDi: Clinical trial protocols. Leishmaniasis. <http://www.dndi.org/2016/clinical-trial-protocols/clinical-trial-protocol-leish/> (abgerufen am 13.01.2017).
42. Musa, A.; Khalil, E.; Hailu, A.; Olobo, J.; Balasegaram, M.; Omollo, R.; Edwards, T.; Rashid, J.; Mbui, J.; Musa, B.; Abuzaid, A. A.; Ahmed, O.; Fadlalla, A.; El-Hassan, A.; Mueller, M.; Mucee, G.; Njoroge, S.; Manduku, V.; Mutuma, G.; Apadet, L.; Lodenyo, H.; Mutea, D.; Kirigi, G.; Yifru, S.; Mengistu, G.; Hurissa, Z.; Hailu, W.; Weldegebreal, T.; Tafes, H.; Mekonnen, Y.; Makonnen, E.; Ndegwa, S.; Sagaki, P.; Kimutai, R.; Kesusu, J.; Owiti, R.; Ellis, S.; Wasunna, M.: Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. *PLoS neglected Trop. Dis.* **2012**, 6, e1674.
43. Reynolds, K. A.; Loughlin, W. A.; Young, D. J.: Quinolines as chemotherapeutic agents for leishmaniasis. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, 13, 730–743.
44. Miranda-Verastegui, C.; Tulliano, G.; Gyorkos, T. W.; Calderon, W.; Rahme, E.; Ward, B.; Cruz, M.; Llanos-Cuentas, A.; Matlashewski, G.: First-line therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist imiquimod in combination with pentavalent antimony. *PLoS neglected Trop. Dis.* **2009**, 3, e491.
45. Fairlamb, A. H.; Cerami, A.: Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1985**, 14, 187–198.
46. Flohé, L.: The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. *Int. J. Med. Microbiol.* **2012**, 302, 216–220.
47. Krauth-Siegel, R. L.; Meiering, S. K.; Schmidt, H.: The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. *Biol. Chem.* **2003**, 384, 539–549.
48. Krauth-Siegel, R. L.; Comini, M. A.: Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1780, 1236–1248.
49. Leroux, A. E.; Krauth-Siegel, R. Luise.: Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2015**, 206, 67–74.
50. Krauth-Siegel, R. L.; Leroux, A. E.: Low-molecular-mass antioxidants in parasites. *Antioxid. Redox Signaling* **2012**, 17, 583–607.
51. Diederich, K.; Krauth-Siegel, R. L.: Trypanothion – Wunderwaffe und Achillesferse der Trypanosomatiden. *BIOspektrum* **2016**, 22, 344–347.
52. Irigoín, F.; Cibils, L.; Comini, M. A.; Wilkinson, S. R.; Flohé, L.; Radi, R.: Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, 45, 733–742.
53. Manta, B.; Comini, M.; Medeiros, A.; Hugo, M.; Trujillo, M.; Radi, R.: Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1830, 3199–3216.
54. Heby, O.; Persson, L.; Rentala, M.: Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of african sleeping sickness, chagas' disease, and leishmaniasis. *Amino acids* **2007**, 33, 359–366.
55. Oza, S. L.; Shaw, M. P.; Wyllie, S.; Fairlamb, A. H.: Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2005**, 139, 107–116.
56. Comini, M.; Menge, U.; Flohé, L.: Biosynthesis of trypanothione in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol. Chem.* **2003**, 384, 653–656.
57. Oza, S. L.; Tetaud, E.; Ariyanayagam, M. R.; Warnon, S. S.; Fairlamb, A. H.: A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 35853–35861.
58. Sousa, A. F.; Gomes-Alves, A. G.; Benítez, D.; Comini, M. A.; Flohé, L.; Jaeger, T.; Passos, J.; Stuhlmann, F.; Tomás, A. M.; Castro, H.: Genetic and chemical analyses reveal that trypanothione synthetase but not glutathionylspermidine synthetase is essential for *Leishmania infantum*. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, 73, 229–238.

59. Fyfe, P. K.; Oza, S. L.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N.: *Leishmania* trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 17672–17680.
60. Henderson, G. B.; Yamaguchi, M.; Novoa, L.; Fairlamb, A. H.; Cerami, A.: Biosynthesis of the trypanosomatid metabolite trypanothione: purification and characterization of trypanothione synthetase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry* **1990**, *29*, 3924–3929.
61. Smith, K.; Nadeau, K.; Bradley, M.; Walsh, C.; Fairlamb, A. H.: Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*. *Protein Sci.* **1992**, *1*, 874–883.
62. Comini, M.; Menge, U.; Wissing, J.; Flohé, L.: Trypanothione synthesis in *Crithidia* revisited. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 6850–6860.
63. Comini, M. A.; Guerrero, S. A.; Haile, S.; Menge, U.; Lünsdorf, H.; Flohé, L.: Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36*, 1289–1302.
64. Torrie, L. S.; Wyllie, S.; Spinks, D.; Oza, S. L.; Thompson, S.; Harrison, J. R.; Gilbert, I. H.; Wyatt, P. G.; Fairlamb, A. H.; Frearson, J. A.: Chemical validation of trypanothione synthetase: a potential drug target for human trypanosomiasis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 36137–36145.
65. Ravaschino, E. L.; Docampo, R.; Rodriguez, J. B.: Design, synthesis, and biological evaluation of phosphinopeptides against *Trypanosoma cruzi* targeting trypanothione biosynthesis. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 426–435.
66. Krieger, S.; Schwarz, W.; Ariyanayagam, M. R.; Fairlamb, A. H.; Krauth-Siegel, R. L.; Clayton, C.: Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 542–552.
67. Koch, O.; Cappel, D.; Nocker, M.; Jäger, T.; Flohé, L.; Sotriffer, C. A.; Selzer, P. M.: Molecular dynamics reveal binding mode of glutathionylspermidine by trypanothione synthetase. *PloS one* **2013**, *8*, e56788.
68. Spinks, D.; Torrie, L. S.; Thompson, S.; Harrison, J. R.; Frearson, J. A.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H.; Wyatt, P. G.; Gilbert, I. H.: Design, synthesis and biological evaluation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase inhibitors. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 95–106.
69. Saudagar, P.; Saha, P.; Saikia, A. K.; Dubey, V. K.: Molecular mechanism underlying antileishmanial effect of oxabicyclo[3.3.1]nonanones: inhibition of key redox enzymes of the pathogen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 569–577.
70. Oza, S. L.; Chen, S.; Wyllie, S.; Coward, J. K.; Fairlamb, A. H.: ATP-dependent ligases in trypanothione biosynthesis - kinetics of catalysis and inhibition by phosphinic acid pseudopeptides. *FEBS J.* **2008**, *275*, 5408–5421.
71. Saudagar, P.; Dubey, V. K.: Cloning, expression, characterization and inhibition studies on trypanothione synthetase, a drug target enzyme, from *Leishmania donovani*. *Biol. Chem.* **2011**, *392*, 1113–1122.
72. Kunick, C.: Synthese von 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6-(5*H*)-onen und 6,11-Dihydro-thieno-[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-on. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1992**, *325*, 297–299.
73. Zaharevitz, D. W.; Gussio, R.; Leost, M.; Senderowicz, A. M.; Lahusen, T.; Kunick, C.; Meijer, L.; Sausville, E. A.: Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2566–2569.
74. Kunick, C.; Lauenroth, K.; Leost, M.; Meijer, L.; Lemcke, T.: 1-Azakenpaullone is a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 413–416.

75. Kunick, C.; Lauenroth, K.; Wieking, K.; Xie, X.; Schultz, C.; Gussio, R.; Zaharevitz, D.; Leost, M.; Meijer, L.; Weber, A.; Jørgensen, F. S.; Lemcke, T.: Evaluation and comparison of 3D-QSAR CoMSIA models for CDK1, CDK5, and GSK-3 inhibition by paullones. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 22–36.
76. Leost, M.; Schultz, C.; Link, A.; Wu, Y.-Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Bibb, J. A.; Snyder, G. L.; Greengard, P.; Zaharevitz, D. W.; Gussio, R.; Senderowicz, A. M.; Sausville, E. A.; Kunick, C.; Meijer, L.: Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5983–5994.
77. Flohé, L.: In search of trypanocidal drugs. In: *Drug discovery in infectious diseases. Antiparasitic and antibacterial drug discovery: From molecular targets to drug candidates*. Selzer, P. M., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim **2009**, 220.
78. Stuhlmann, F.; Jaeger, T.; Flohé, L.; Schinzer, D.: *N*<sup>5</sup>-substituted benzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6-ones for treating tropical diseases. EP 1 757 607 A1 **2005**.
79. Flohé, L.: The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 294–301.
80. Benítez, D.; Medeiros, A.; Fiestas, L.; Panozzo-Zenere, E. A.; Maiwald, F.; Prousis, K. C.; Roussaki, M.; Calogeropoulou, T.; Detsi, A.; Jaeger, T.; Šarlauskas, J.; Peterlin Mašič, L.; Kunick, C.; Labadie, G. R.; Flohé, L.; Comini, M. A.: Identification of novel chemical scaffolds inhibiting trypanothione synthetase from pathogenic trypanosomatids. *PLoS neglected Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004617.
81. Jäger, T.; Koch, O.; Flohé, L.; Selzer, P. M.: Inhibition of trypanothione synthetase as a therapeutic concept. In: *Trypanosomatid diseases. Molecular routes to drug discovery*. Jäger, T.; Koch, O.; Flohé, L.; Selzer, P. M., Eds.; WILEY-VCH GmbH & Co KGaA: Weinheim **2013**, 436–438.
82. Korn, R.: *N*<sup>5</sup>-substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**, 73, 75, 79–91, 108, 147.
83. Korn, R.: *N*<sup>5</sup>-substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**, 75.
84. Klebe, G.: *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2. Auflage **2009**, 303–306.
85. Jones, G.; Willett, P.: Docking small-molecule ligands into active sites. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, *6*, 652–656.
86. RCSB PDB. Protein data bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (abgerufen am 13.01.2017).
87. Sousa, S. F.; Ribeiro, A.; Coimbra, J.; Neves, R.; Martins, S. A.; Moorthy, N.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J.: Protein-Ligand docking in the new millennium – A retrospective of 10 years in the field. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2296–2314.
88. Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E.: A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **1982**, *161*, 269–288.
89. Kuntz, I. D.: Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science* **1992**, *257*, 1078–1082.
90. Yuriev, E.; Ramsland, P. A.: Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. *J. Mol. Recognit.* **2013**, *26*, 215–239.
91. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R.: Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.
92. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.: Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43–53.

93. Korb, O.; Stutzle, T.; Exner, T. E.: Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 84–96.
94. Liebeschuetz, J. W.; Cole, J. C.; Korb, O.: Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2012**, *26*, 737–748.
95. Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbrook St. West, Suite #910, Montreal QC, Canada, H3A 2R7, **2013**.
96. Orban, O. C. F.; Korn, R. S.; Benitez, D.; Medeiros, A.; Preu, L.; Loaec, N.; Meijer, L.; Koch, O.; Comini, M. A.; Kunick, C.: 5-Substituted 3-chlorokenpaullone derivatives are potent inhibitors of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3790–3800.
97. Desiraju, G. R.: A bond by any other name. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 52–59.
98. Jeffrey, G. A.: An introduction to hydrogen bonding; Oxford University Press: New York **1997**, 11–16.
99. Montoro, T.; Tardajos, G.; Guerrero, A.; Torres, M. d. R.; Salgado, C.; Fernandez, I.; Osio Barcina, J.:  $\delta$ -Hole $\cdots\pi$  and lone pair $\cdots\pi$  interactions in benzylic halides. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6194–6202.
100. Wilcken, R.; Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Joerger, A. C.; Boeckler, F. M.: Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1363–1388.
101. Auffinger, P.; Hays, F. A.; Westhof, E.; Ho, P. S.: Halogen bonds in biological molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 16789–16794.
102. Korn, R.:  $N^{\delta}$ -substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**, 77, 78.
103. Korn, R.:  $N^{\delta}$ -substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**, 99, 126–128.
104. Reichwald, C. J.: Eine neue Variante der Heck-Reaktion zur Darstellung antileishmanieller Paullone. Technische Universität Braunschweig, **2008**, 154–155.
105. Sattlegger, M.; Buschmann, H.; Przewosny, M.; Englberger, W.; Koegel, B.-Y.; Schick, H.: Substituted benzo[b]azepin-2-one compounds. US2004/0224938 A1 **2004**.
106. Schultz, C.; Link, A.; Leost, M.; Zaharevitz, D. W.; Gussio, R.; Sausville, E. A.; Meijer, L.; Kunick, C.: Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2909–2919.
107. Stout, D. M.; Matier, W. L.; Barcelon-Yang, C.; Reynolds, R. D.; Brown, B. S. J.: Synthesis and antiarrhythmic and parasympholytic properties of substituted phenols. 1. Heteroarylamine derivatives. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 808–813.
108. Jo, M. N.; Seo, H. J.; Kim, Y.; Seo, S. H.; Rhim, H.; Cho, Y. S.; Cha, J. H.; Koh, H. Y.; Choo, H.; Pae, A. N.: Novel T-type calcium channel blockers: dioxoquinazoline carboxamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 365–373.
109. Korn, R.:  $N^{\delta}$ -substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**, 131, 132.
110. Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B.: PyBOP: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205–208.
111. Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C.: Reactifs de couplage peptidique I (1) - l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl *N*-oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219–1222.
112. Korn, R.:  $N^{\delta}$ -substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**, 98.

113. Nystrom, R. F.; Brown, W. G.: Reduction of organic compounds by lithium aluminum hydride. III. Halides, quinones, miscellaneous nitrogen compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3738–3740.
114. Brown, H. C.; Tsukamoto, A.: Selective reductions. V. The partial reduction of tertiary amides by lithium di- and triethoxyaluminumhydrides - A new aldehyde synthesis via the dimethylamides. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1089–1095.
115. Herbert C, B.; Weissman, P. M.; Yoon, N. M.: Selective Reductions. IX. Reaction of lithium aluminum hydride with selected organic compounds containing representative functional groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1458–1463.
116. Korn, R.: *N*<sup>6</sup>-substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**, 40, 41, 51, 52.
117. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 7. Auflage **2005**, 89–104.
118. Friebolin, H.: *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*; Wiley-VCH: Weinheim, 4. Auflage **2006**, 76, 77.
119. D'hooghe, M.; Kimpe, N. de.: Synthetic approaches towards 2-iminothiazolidines: An overview. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 513–535.
120. Rogers, M. E.; Glennon, R. A.; Smith, J. D.; Boots, M. R.; Nanavati, N.; Maconaughey, J. E.: Mesoionic purinone analogues as inhibitors of cyclic-AMP phosphodiesterase: a comparison of several ring systems. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 1284–1287.
121. Bucio-Cano, A.; Reyes-Arellano, A.; Correa-Basurto, J.; Bello, M.; Torres-Jaramillo, J.; Salgado-Zamora, H.; Curiel-Quesada, E.; Peralta-Cruz, J.; Avila-Sorrosa, A.: Targeting quorum sensing by designing azoline derivatives to inhibit the *N*-hexanoyl homoserine lactone-receptor CviR: Synthesis as well as biological and theoretical evaluations. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 7565–7577.
122. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 7. Auflage **2005**, 99–104.
123. Maiwald, F.; Benítez, D.; Charquero, D.; Dar, M. A.; Erdmann, H.; Preu, L.; Koch, O.; Hölscher, C.; Loaëc, N.; Meijer, L.; Comini, M. A.; Kunick, C.: 9- and 11-substituted 4-azapaullones are potent and selective inhibitors of African trypanosoma. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *83*, 274–283.
124. Demoro, B.; Sarniguet, C.; Sánchez-Delgado, R.; Rossi, M.; Liebowitz, D.; Caruso, F.; Olea-Azar, C.; Moreno, V.; Medeiros, A.; Comini, M. A.; Otero, L.; Gambino, D.: New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 1534–1543.
125. Ishiyama, M.; Shiga, M.; Sasamoto, K.; Mizoguchi, M.; He, P.: A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1118–1122.
126. Berridge, M. V.; Herst, P. M.; Tan, A. S.: Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2005**, *11*, 127–152.
127. Ishiyama, M.; Tominaga, H.; Shiga, M.; Sasamoto, K.; Ohkura, Y.; Ueno, K.: A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 1518–1520.
128. Balinsky, D.; Cayanis, E.; Bersohn, I.: Comparative kinetic study of human pyruvate kinases isolated from adult and fetal livers and from hepatoma. *Biochemistry* **1973**, *12*, 863–870.
129. Ainsworth, S.; MacFarlane, N.: A kinetic study of rabbit muscle pyruvate kinase. *Biochem. J.* **1973**, *131*, 223–236.
130. Hess, H. H.; Derr J. E.: Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1–5 nanomole range. *Anal. Biochem.* **1975**, *63*, 607–613.

131. Martin, B.; Pallen, C. J.; Wange, J. H.; Graves, D. J.: Use of fluorinated tyrosine phosphates to probe the substrate specificity of the low molecular weight phosphatase activity of calcineurin. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 14932–14937.
132. Altmann, H. J.; Fürstenau, E.; Gielewski, A.; Scholz, L.: Photometrische Bestimmung kleiner Phosphatmengen mit Malachitgrün. *Z. Anal. Chem.* **1971**, 256, 274–276.
133. Baykov, A. A.; Evtushenko, O. A.; Avaeva, S. M.: A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* **1988**, 171, 266–270.
134. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, 150, 76–85.
135. Wiechelman, K. J.; Braun, R. D.; Fitzpatrick, J. D.: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **1988**, 175, 231–237.
136. Lipinski, C. A.: Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technol.* **2004**, 1, 337–341.
137. Klebe, G.: *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2. Auflage **2009**, 284–286.
138. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V.: iLOGP: a simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, 54, 3284–3301.
139. Wildman, S. A.; Crippen, G. M.: Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, 39, 868–873.
140. Moriguchi, I.; Hirono, S.; Nakagome, I.; Hirano, H.: Comparison of reliability of log P values for drugs calculated by several methods. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 976–978.
141. Moriguchi, I.; Hirono, S.; Liu, Q.; Nakagome, I.; Matsushita, Y.: Simple method of calculating octanol/water partition coefficient. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 127–130.
142. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 46, 3–26.
143. <http://www.silicos-it.com/> (abgerufen am 10.01.2017).
144. SIB: Swiss institute of bioinformatics. SwissADME. <http://www.swissadme.ch/> (abgerufen am 10.01.2017).
145. Delaney, J. S.: ESOL: estimating aqueous solubility directly from molecular structure. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, 44, 1000–1005.
146. Ali, J.; Camilleri, P.; Brown, M. B.; Hutt, A. J.; Kirton, S. B.: Revisiting the general solubility equation: in silico prediction of aqueous solubility incorporating the effect of topographical polar surface area. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 420–428.
147. Wölfel, S.: *Neue Inhibitoren der Anaplastic Lymphoma Kinase*, Dissertation Technische Universität Braunschweig; Shaker Verlag: Aachen **2014**, 161–163.
148. Bhattachar, S. N.; Deschenes, L. A.; Wesley, J. A.: Solubility: it's not just for physical chemists. *Drug discovery today* **2006**, 11, 1012–1018.
149. Bevan, C. D.; Lloyd, R. S.: A high-throughput screening method for the determination of aqueous drug solubility using laser nephelometry in microtiter plates. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1781–1787.
150. BMG LABTECH. The microplate reader company. A fully automated kinetic solubility screen in 384-well plate format using nephelometry. <http://www.bmg-labtech.com/en/applications/application-notes/117-a-fully-automated-kinetic-solubility-screen-in-384-well-plate-format-using-nephelometry-obj-91-895.html> (abgerufen am 10.01.2017).

151. Kerns, E. H.; Di, I.; Carter, G. T.: *In vitro* solubility assays in drug discovery. *Curr. Drug Metab.* **2008**, 9, 879–885.
152. Carredano, E.; Baumann, H.: Affinity ligands from chemical combinatorial libraries. *In: Protein purification. Principles, high resolution methods, and applications.* Janson, J.-C., Ed.; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA, 3. Auflage **2011**, 259–267.
153. Prühs, C.: Strukturmodifikationen und Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Darponen. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2007**, 66.
154. Korn, R.: *N*<sup>6</sup>-substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**, 108.
155. Prühs, C.: Strukturmodifikationen und Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Darponen. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2007**, 226–229.
156. Prühs, C.: Strukturmodifikationen und Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Darponen. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2007**, 166.
157. Wieking, K.; Knockaert, M.; Loest, M.; Zaharevitz, D. W.; Meijer, L.; Kunick, C.: Synthesis of paullones with aminoalkyl side chains. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, 7, 311–317.
158. Greenwald, R. B.; Zhao, H.; Xia, J.; Wu, D.; Nervi, S.; Stinson, S. F.; Majerova, E.; Bramhall, C.; Zaharevitz, D. W.: Poly(ethylene glycol) prodrugs of the CDK inhibitor, alsterpaullone (NSC 705701): synthesis and pharmacokinetic studies. *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 1076–1083.
159. Schuster, V. L.; CHI, Y.; Wasmuth, A.; Pottorf, R. S.; Olson, G. L.: Prostaglandin transporter inhibitors and uses thereof. WO-2011037610-A1, **2009**.
160. Korn, R.: *N*<sup>6</sup>-substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**, 73.
161. PyMOL, DeLano Scientific LLC.
162. Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L.: *Purification of laboratory chemicals*; Butterworth-Heinemann: Bodwin, Cornwall, USA **2003**, 84, 198, 199, 219, 361, 370.
163. Korn, R.: *N*<sup>6</sup>-substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**, 99, 105, 106, 126–128.
164. Korn, R.: *N*<sup>6</sup>-substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**, 105.
165. Korn, R.: *N*<sup>6</sup>-substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2014**, 106.
166. Rossetti, V.; Alessandro, D.; Fantin, G.: N-(4-hydroxybenzyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide and method for producing trimethoxybenzamide chlorohydrate. US4507499, **1985**.
167. Chichak, K. S.; Peters, A. J.; Cantrill, S. J.; Stoddart, J. F.: Nanoscale borromean rings. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 7956–7962.
168. Sondhi, S.; Rani, R.: A convenient, solvent free and high yielding synthesis of bicyclo-heterocyclic compounds. *Lett. Org. Chem.* **2008**, 5, 51–54.
169. Coyle, J. D.; Bryant, L. R. B.: Synthesis of diazaheterocycles with a bridgehead nitrogen by photocyclisation of *N*-substituted alicyclic imides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1983**, 2857–2865.
170. Poindexter, G. S.: 2-Ethyl-4,5-dihydro-1,3-oxazole: a useful aziridine equivalent for the preparation of substituted 1,2-ethanediamines. *Synthesis* **1981**, 7, 541–543.
171. Spectral database for organic compounds. SDBS. [http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi) (abgerufen am 16.01.2017).

172. Prühs, C.: Strukturmodifikationen und Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Darponen. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2007**, 226–229.
173. Tang, W.; Fang, S.: Mono-acylation of symmetric diamines in the presence of water. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 6003–6006.
174. Hirumi, H.; Hirumi K.: Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing at low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J. Parasitol* **1989**, 75, 985–989.
175. Oza, S. L.; Ariyanayagam, M. R.; Aitcheson, N.; Fairlamb, A. H.: Properties of trypanothione synthetase from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, 131, 25–33.
176. Peacock, C. S.; Seeger, K.; Harris, D.; Murphy, L.; Ruiz, J. C.; Quail, M. A.; Peters, N.; Adlem, E.; Tivey, A.; Aslett, M.; Kerhornou, A.; Ivens, A.; Fraser, A.; Rajandream, M.-A.; Carver, T.; Norbertczak, H.; Chillingworth, T.; Hance, Z.; Jagels, K.; Moule, S.; Ormond, D.; Rutter, S.; Squares, R.; Whitehead, S.; Rabinowitsch, E.; Arrowsmith, C.; White, B.; Thurston, S.; Bringaud, F.; Baldauf, S. L.; Faulconbridge, A.; Jeffares, D.; Depledge, D. P.; Oyola, S. O.; Hilley, J. D.; Brito, L. O.; Tosi, Luiz R O; Barrell, B.; Cruz, A. K.; Mottram, J. C.; Smith, D. F.; Berriman, M.: Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* **2007**, 39, 839–847.
177. Taylor, M. C.; Kaur, H.; Blessington, B.; Kelly, J. M.; Wilkinson, S. R.: Validation of spermidine synthase as a drug target in African trypanosomes. *Biochem. J.* **2008**, 409, 563–569.
178. Ariyanayagam, M. R.; Oza, S. L.; Mehlert, A.; Fairlamb, A. H.: Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 27612–27619.
179. Coombs, G. H.; Sanderson, B. E.: Amine production by *Leishmania mexicana*. *Ann. Trop. Med. Parasitol* **1985**, 79, 409–415.



## 12. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Morphologische Erscheinungsbilder der Trypanosomatiden .....	2
Abbildung 1-2: Lebens- und Vermehrungszyklus von <i>T. cruzi</i> -Parasiten .....	4
Abbildung 1-3: Arzneistoffe zur Therapie der Amerikanischen Trypanosomiasis .....	6
Abbildung 1-4: Aktive Substanzen aus klinischen Studien zur Therapie der Amerikanischen Trypanosomiasis .....	6
Abbildung 1-5: Lebens- und Vermehrungszyklus von <i>T. brucei rhodesiense</i> und <i>T. brucei gambiense</i> .....	8
Abbildung 1-6: Arzneistoffe zur Behandlung des ersten Stadiums der Afrikanischen Trypanosomiasis .....	10
Abbildung 1-7: Arzneistoffe zur Behandlung des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit einschließlich Melarsenoxid als aktiven Metaboliten des Melarsoprols .....	11
Abbildung 1-8: Aktive Verbindungen aus klinischen Studien zur Therapie der humanen Afrikanischen Trypanosomiasis .....	12
Abbildung 1-9: Lebens- und Vermehrungszyklus von <i>Leishmania</i> -Parasiten .....	13
Abbildung 1-10: Eingesetzte Arzneistoffe zur Behandlung der Leishmaniose .....	15
Abbildung 1-11: Arzneistoffe aus klinischen Studien zur Therapie der Leishmaniose .....	17
Abbildung 1-12: Der Trypanothionmetabolismus .....	18
Abbildung 1-13: Biosynthese des Trypanothions .....	20
Abbildung 1-14: Kristallstruktur 2VPS der <i>L. major</i> -TryS mit Amidase-Domäne und Synthetase-Domäne .....	23
Abbildung 1-15: Literaturbekannte Inhibitoren der TryS .....	24
Abbildung 1-16: Das Kenpaullon ( <b>28</b> ) .....	25
Abbildung 1-17: Literaturbekannte $N^{\delta}$ -substituierte Paullone mit Hemmwirkung auf die TryS .....	26
Abbildung 2-1: 3-Chlorkenpaullon ( <b>32</b> ) und $N^{\delta}$ -substituierte 3-Chlorkenpaullone <b>33</b> und <b>34</b> .....	27
Abbildung 2-2: Zielverbindungen <b>35</b> .....	28
Abbildung 2-3: Substitutionen und reduktive Modifikationen an Verbindungen mit 3-Chlorkenpaullon-Grundkörper .....	29
Abbildung 3-1: Modelle verschiedener Trypanothionsynthetasen für das Protein-Liganden- <i>docking</i> .....	32
Abbildung 3-2: Vergleich der TryS-Modelle .....	32
Abbildung 3-3: Herleitung eines Bindungsmodus .....	34
Abbildung 3-4: Bindungsmodus des Paullon- $N^{\delta}$ -acetamids <b>36d</b> in der <i>L</i> TryS .....	35
Abbildung 3-5: Untersuchungen zu möglichen Halogenbindungen der Verbindung <b>36d</b> in der ATP-Bindetasche der <i>L</i> TryS .....	37

Abbildung 3-6: Ausgewählte Posen der Verbindungen <b>36g</b> , <b>36h</b> und <b>36i</b> in der ATP-Bindetasche der <i>L</i> TryS .....	38
Abbildung 3-7: Selektierte Posen der Verbindungen <b>36j</b> , <b>36k</b> , <b>36e</b> und <b>36f</b> in der ATP-Bindetasche der <i>L</i> TryS .....	39
Abbildung 3-8: Posen der Verbindungen <b>36m</b> und <b>36p</b> in der ATP-Bindetasche der <i>L</i> TryS.....	40
Abbildung 3-9: Pose der Verbindung <b>37d</b> in der ATP-Bindetasche der <i>L</i> TryS .....	41
Abbildung 3-10: Belegung der ATP-Bindetasche der <i>Tc</i> TryS durch die Verbindungen <b>35e</b> , <b>35h</b> , <b>35k</b> und <b>35f</b> .....	43
Abbildung 3-11: Posen der Verbindungen <b>35c</b> und <b>35d</b> in der ATP-Bindetasche der <i>Tc</i> TryS .....	44
Abbildung 3-12: Bindungsmodi der Verbindungen <b>35g</b> und <b>35j</b> in der ATP-Bindetasche der <i>Tb</i> TryS .....	45
Abbildung 3-13: Pose der Verbindungen <b>35d</b> in der ATP-Bindetasche der <i>Tb</i> TryS .....	46
Abbildung 3-14: Hypothetische Bindungsmodi der Verbindungen <b>36l</b> , <b>36p</b> und <b>36s</b> in der <i>L</i> TryS.....	48
Abbildung 3-15: Bindungsmodi der Verbindungen <b>36g</b> und <b>36i</b> in der <i>Tc</i> TryS.....	49
Abbildung 3-16: Posen der Verbindungen <b>35h</b> und <b>35g</b> in der <i>Tb</i> TryS.....	50
Abbildung 4-1: 3-Chlorkenpaullon ( <b>32</b> ) als Zielstruktur der Synthesesequenz .....	52
Abbildung 4-2: <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der Verbindung <b>32</b> .....	65
Abbildung 4-3: <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der Verbindung <b>35a</b> stellvertretend für neue Paullon- <i>N</i> <sup>5</sup> -acetamide.....	66
Abbildung 4-4: Ausschnitt aus dem H,C-HSQC-Spektrum der Verbindung <b>35a</b> .....	67
Abbildung 4-5: Ausschnitt aus dem H,H-COSY-Spektrum der Verbindung <b>35a</b> .....	68
Abbildung 4-6: <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum des <i>N</i> <sup>12</sup> -substituierten Paullons <b>37c</b> .....	69
Abbildung 4-7: <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der <i>N</i> <sup>5</sup> , <i>N</i> <sup>12</sup> -disubstituierten Verbindung <b>37d</b> .....	70
Abbildung 4-8: <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der Verbindung <b>36w</b> , dargestellt als <i>N</i> -(Thiazolin-2-yl)amid .....	71
Abbildung 4-9: 4,5-Dihydro-1,3-thiazol-2-amin ( <b>53</b> ) .....	71
Abbildung 4-10: Tautomerie der Verbindung <b>36w</b> .....	72
Abbildung 5-1: Ergebnis der Proliferationsuntersuchung von Verbindung <b>35h</b> .....	74
Abbildung 5-2: PK/LDH-Assay am Beispiel der <i>L</i> TryS-Aktivität.....	76
Abbildung 5-3: Ergebnisse der SDS-PAGE nach der IMAC und nach der SEC am Beispiel der <i>L</i> TryS.....	79
Abbildung 6-1: Ergebnis der Untersuchung zur kinetischen Löslichkeit von <b>36k</b> .....	91
Abbildung 7-1: Möglicher Ablauf einer Affinitätsuntersuchung mit einem immobilisierten Paullon .....	95
Abbildung 7-2: Verbindung <b>33</b> und geplantes Syntheseziel <b>61</b> .....	96

Abbildung 8-1: Neue $N^5$ -substituierte 3-Chlorkenpaullone mit biologischer Aktivität .....	103
Abbildung 8-2: Paullone zur Affinitätsuntersuchung.....	104
Abbildung 8-3: Reduktionsprodukte <b>38</b> .....	104
Figure 9-1: New $N^5$ -substituted 3-chlorokenpaullones with biological activity.....	106
Figure 9-2: Paullones for affinity experiments.....	107
Figure 9-3: Reduction products <b>38</b> .....	107

### 13. Verzeichnis der Schemata

Schema 4-1: Synthese des Amids <b>40</b> .....	52
Schema 4-2: Synthese der Verbindung <b>41</b> durch eine Dieckmann-Esterkondensation.....	53
Schema 4-3: Dealkoxycarbonylierung der Verbindung <b>41</b> .....	53
Schema 4-4: Fischer-Indol-Synthese des 3-Chlorkenpaullons ( <b>32</b> ) .....	54
Schema 4-5: Selektive Substitution am $N^6$ des 3-Chlorkenpaullons ( <b>32</b> ) .....	54
Schema 4-6: Präparative Darstellung von 9-Brom-3-chlor-5-(2-hydroxyethyl)-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepin-6(5 <i>H</i> )-on ( <b>36e</b> ) durch Reduktion mit $LiAlH_4$ .....	56
Schema 4-7: Versuche zur Synthese der Verbindung <b>36f</b> .....	57
Schema 4-8: Synthese zur selektiven Substitution am $N^{12}$ des 3-Chlorkenpaullons ( <b>32</b> ) .....	58
Schema 4-9: Synthese von 4-Hydroxybenzylamin Hydrobromid ( <b>47</b> ) durch eine saure Etherspaltung .....	59
Schema 4-10: Gabriel-Synthese primärer aliphatischer Amine <b>50a-b</b> .....	59
Schema 4-11: Spaltung des <i>tert</i> -Butylesters hin zur Paullon- $N^6$ -essigsäure ( <b>51</b> ) .....	60
Schema 4-12: Amidsynthese von neuen Paullon- $N^6$ -acetamiden durch eine Amidkupplung unter Standardbedingungen .....	61
Schema 4-13: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und Isolierung der erhaltenen Produkte als Hydrochloride <b>36p</b> und <b>36s</b> .....	63
Schema 4-14: Reduktion von Paullonen mit $LiAlH_4$ zu den Verbindungen <b>38a</b> und <b>38b</b> .....	64
Schema 5-1: Umsetzung des WST-1 ( <b>54</b> ) zum Formazan <b>55</b> .....	75
Schema 5-2: Ablauf des PK/LDH-Assays .....	76
Schema 5-3: Grundlage der Phosphatbestimmung mittels Malachitgrün-Reagenz.....	77
Schema 5-4: Theoretischer Hintergrund des BCA-Assays .....	78
Schema 7-1: Synthesesequenz des polaren <i>spacers</i> <b>65</b> ausgehend von Tetraethylenglycol ( <b>62</b> ).....	97
Schema 7-2: Versuche zur Synthese der Verbindung <b>61</b> durch Umsetzung des Paullons <b>35g</b> mit dem Tetraethylenglykol-Derivat <b>65</b> .....	98
Schema 7-3: Synthese eines $N^6$ -substituierten Paullons <b>69</b> zur Affinitätsuntersuchung.....	99
Schema 7-4: Versuch zur Synthese des Paullon <b>71</b> für eine Affinitätsuntersuchung .....	100
Schema 7-5: Synthese des Paullons <b>75</b> zur Affinitätsuntersuchung .....	101
Schema 7-6: Synthese der Kontrollverbindung <b>78</b> zur Affinitätsuntersuchung .....	102

## 14. Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Synthetisierte $N^{\delta}$ -substituierte Paullone .....	55
Tabelle 4-2: Vergleich von zwei Methoden zur Synthese der Verbindung <b>36d</b> .....	55
Tabelle 4-3: Verschieden substituierte 3-Chlorkenpaullone <b>37a–d</b> .....	58
Tabelle 4-4: Durch Amidkupplung synthetisierte Paullon- $N^{\delta}$ -acetamide <b>35</b> .....	61
Tabelle 4-5: Durch Amidkupplung synthetisierte Paullon- $N^{\delta}$ -acetamide <b>36</b> .....	62
Tabelle 5-1: Biochemische und biologische Evaluierung der Verbindungen <b>35</b> .....	81
Tabelle 5-2: Biochemische und biologische Evaluierung der Verbindungen <b>36d–k</b> .....	83
Tabelle 5-3: Biochemische und biologische Evaluierung der Verbindungen <b>36l–s</b> .....	85
Tabelle 5-4: Biochemische und biologische Evaluierung der Verbindungen <b>36t–y</b> .....	87
Tabelle 5-5: Biochemische und biologische Evaluierung von Verbindungen <b>37</b> .....	88
Tabelle 5-6: Untersuchungen zur Hemmwirkung ausgewählter Verbindungen auf <i>L. infantum</i> -Promastigoten .....	89
Tabelle 6-1: Physikochemische Eigenschaften ausgewählter neuer Paullone .....	93
Tabelle 10-1: Proliferation von <i>T. brucei brucei</i> vom Wildtyp 427 im initialen Screening bei 5 $\mu$ M Inhibitorkonzentration .....	174
Tabelle 10-2: Proliferation von <i>T. brucei brucei</i> vom Wildtyp 427 bei verschiedenen Inhibitor- konzentrationen .....	174
Tabelle 10-3: $EC_{50}$ -Werte aktiver Verbindungen an <i>T. brucei brucei</i> vom Wildtyp 427 .....	175
Tabelle 10-4: Proliferation von <i>T. brucei brucei</i> der Zelllinie 449 GFP im initialen Screening bei 5 $\mu$ M Inhibitorkonzentration .....	175
Tabelle 10-5: Proliferation von <i>T. brucei brucei</i> der Zelllinie 449 GFP bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen .....	176
Tabelle 10-6: $EC_{50}$ -Werte aktiver Verbindungen an <i>T. brucei brucei</i> der Zelllinie 449 GFP ..	177
Tabelle 10-7: Proliferation von <i>L. infantum</i> -Promastigoten bei 5 $\mu$ M Inhibitorkonzentration .....	178
Tabelle 10-8: Aktivität der <i>L</i> TryS bei 30 $\mu$ M Inhibitorkonzentration .....	183
Tabelle 10-9: Aktivität der <i>L</i> TryS bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen .....	183
Tabelle 10-10: $IC_{50}$ -Werte von <i>L</i> TryS-Inhibitoren .....	185
Tabelle 10-11: Aktivität der <i>Tb</i> TryS bei 30 $\mu$ M Inhibitorkonzentration .....	186
Tabelle 10-12: Aktivität der <i>Tc</i> TryS bei 30 $\mu$ M Inhibitorkonzentration .....	186
Tabelle 10-13: $IC_{50}$ -Werte von <i>Tc</i> TryS-Inhibitoren .....	187
Tabelle 10-14: Zytotoxizität ausgewählter Verbindungen bei unterschiedlichen Konzentrationen .....	189
Tabelle 10-15: $EC_{50}$ -Werte verschiedener Verbindungen an murinen Makrophagen .....	190
Tabelle 10-16: Untersuchungen zu physikochemischen Eigenschaften mit SwissADME ....	192

Tabelle 10-17: Thermodynamische Löslichkeit bestimmt mit einer <i>shake flask</i> -Methode....	193
Tabelle 10-18: Kinetische Löslichkeit bestimmt mit einer nephelometrischen Methode .....	194

## Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn C. Kunick, der mir dieses sehr interessante Thema überlassen hat und der mir als exzellenter Mentor viel Wissen vermitteln konnte. Während meiner Promotion konnte ich mich stets auf ihn verlassen und ich bin ihm für seine Unterstützung der vergangenen Jahre sehr dankbar.

Ich möchte mich auch bei Herrn M. Comini und seinen Mitarbeitern Frau A. Medeiros und Herrn D. Benítez vom Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay, für die gute und kompetente Betreuung während der Forschungsaufenthalte, für die Ratschläge und interessanten Diskussionen, sowie für die biologische Testung der Verbindungen danken. Weiterhin gilt Dank Frau C. Ortiz, Frau F. Sardi, Frau M. Bonilla, Frau S. Zardo, Frau L. Negro, Frau M. Richter, Herrn M. R. Stralioetto und Herrn J. Franco für die fachliche und überfachliche Unterstützung während der Forschungsaufenthalte in Uruguay.

Mein Dank gilt auch Herrn P. Loiseau und Frau E. Davioud-Charvet, die die Anträge für die Forschungsaufenthalte begutachtet und für die Unterstützung im Rahmen der COST action CM1307 gesorgt haben.

Weiterhin möchte ich auch den Wahlpflichtstudenten Frau L. Unger, Frau L. Nering, Frau Y. Atassi, Herrn A. Yildiz und Herrn C. Jede für die Unterstützung im Labor und die Mitarbeit am Molbank-Artikel danken.

Frau B. Thomas, Frau D. Eberle und Herrn T. Hoffmann möchte ich für die allgemeine Organisation und für die Hilfestellung zur Planung der Forschungsaufenthalte danken.

Dank gilt auch Herrn F. Roese und Herrn E. Hinz, die als Mitarbeiter des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie die technischen Voraussetzungen für die Synthesearbeit sichergestellt und die bei technischen Problemen immer zuverlässig geholfen haben. Außerdem möchte ich mich bei Herrn R. Hübner für die Hilfe bei Computertechnischen Fragen bedanken. Herrn K. Hartmann und Herrn M. Söchtig möchte ich meinen Dank für die Bereitstellung von Laborchemikalien und Glasgeräten aussprechen. Weiterhin bedanke ich mich bei Frau P. Reich und Frau S. Meier für die Erstellung der IR-Spektren und der Elementaranalysen, sowie für die Probenvorbereitung der NMR-Experimente.

Für die Durchführung und die Auswertung der NMR-Experimente, sowie für die Hilfestellungen zur Interpretation der Spektren danke ich herzlich Frau K. Ibrom, Frau P. Holba-Schulz und Frau G. Krafft. Dank gilt auch Frau C. Mlynek und Herrn U. Papke für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen und die unkomplizierte Kommunikation.

Besonders herzlich möchte ich mich auch bei Herrn L. Preu für die Hilfestellung und Ratschläge zur Auswertung von NMR-Spektren, sowie für die interessanten Gespräche danken. Dank gilt ihm besonders für die Übernahme der Betreuung im Rahmen meiner Weiterbildung zum Fachapotheker für pharmazeutische Analytik.

Dank möchte ich besonders den dem Arbeitskreis angeschlossenen akademischen Räten, sowie allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern des Arbeitskreises aussprechen, die die Promotionszeit zu einer der angenehmsten und interessantesten Erfahrungen in meinem Werdegang gemacht haben. Die stetige Unterstützung hat die Promotion erst möglich gemacht und die interessanten und humorvollen Gespräche haben für die nötige Abwechslung gesorgt. Hierfür möchte ich Frau R. Korn, Frau A. Walter, Frau L. Schlütke, Frau R. Meine, Herrn S. Wölfel, Herrn H. Falke, Herrn H. Lande, Herrn A. Masch, Herrn T. Weidner, Herrn M. Immer, Herrn C. Lechner, Herrn M. Karatas, Herrn J. Grünefeld und Herrn L. Preu herzlich danken.

Den Assistenten des dritten Semesters möchte ich gern für den kollegialen und unkomplizierten Umgang danken. So hat mir die gemeinsame Arbeit mit Frau L. Schlütke, Frau R. Meine, Herrn T. Weidner, Herrn A. Masch, Herrn C. Lechner, Herrn S. Wölfel, Herrn V. Andermark und Herrn S. Friedrichs viel Freude bereitet.

Ich möchte auch besonders Herrn H. O. Burmeister dafür bedanken, dass er mich von den Vorzügen einer Promotion überzeugt hat. Zudem möchte ich ihm auch für die vielen interessanten Gespräche und seine Unterstützung danken.

Bei Frau R. Meine, Herrn M. Immer, Herrn A. Masch, Herrn T. Weidner, Herrn C. Lechner, Herrn L. Preu, sowie bei meiner Mutter Christina, meinem Bruder Philipp und meinem Vater Siegfried möchte ich mich für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die durch ihre moralische Unterstützung, den Rückhalt und ihr Vertrauen diese Arbeit ermöglichten. Für diese Unterstützung bedanke ich mich besonders bei meiner Mutter, meinem Bruder und meinem Vater. Dieser besondere Dank gilt insbesondere meiner Frau Mariana, die durch ihr Verständnis und ihre Unterstützung ihren Teil zu dieser Arbeit beigetragen hat. Ganz besonderen möchte ich meinem Sohn Arik danken, dafür, dass er da ist und dafür, dass er mir jeden Tag die nötige Kraft gegeben hat, meine Promotion erfolgreich abzuschließen.



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Namen	Oliver Christian Friedrich Orban
Geburtsdaten	21. Februar 1988 in Northeim
Familienstand	verheiratet, 1 Kind

### Schulbildung, Ausbildung und Studium

Dez 2013	Approbation zum Apotheker
Okt 2008 bis Okt 2012	Studium der Pharmazie an der TU Braunschweig
Apr bis Jul 2008	Ausbildung zum staatlich geprüften Rettungssanitäter
Jun 2007	Allgemeine Hochschulreife
Jun 2000 bis Jun 2007	Gymnasium Corvinianum Northeim

### Wehrdienst

Jul 2007 bis Mär 2008	Grundwehrdienst im Sanitätsdienst der Bundeswehr in Weißenfels und Höxter
-----------------------	--

### Berufspraxis und Promotion

Seit Jan 2014	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. C. Kunick
Mai bis Nov 2013	Pharmazeut im Praktikum in der Gauß-Apotheke in Braunschweig
Nov 2012 bis Apr 2013	Pharmazeut im Praktikum in der Medizinischen Hochschule Hannover als Stipendiat der PharmHuman Stiftung